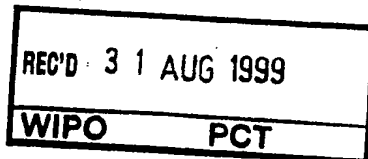


EJU 09/744751 KR99/414

대한민국 특허청

KOREAN INDUSTRIAL
PROPERTY OFFICE



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Industrial
Property Office.

출원번호 : 1998년 특허출원 제31249호
Application Number

출원년월일 : 1998년 7월 31일
Date of Application

출원인 : 한국과학기술연구원
Applicant(s)

**PRIORITY
DOCUMENT**

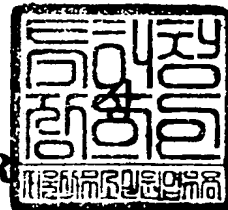
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



1999년 7월 22일

특허청

COMMISSIONER



특허출원서

【출원번호】 98-031249

【출원일자】 1998/07/31

【국제특허분류】 A61K 9/00

【발명의 국문명칭】 유전자 또는 약물을 효과적으로 전달하는 지방유제, 지질미립구 및 이들의 제조방법

【발명의 영문명칭】 LIPID EMULSION AND SOLID LIPID NANOPARTICLE AS A GENE OR DRUG CARRIER

【출원인】

【국문명칭】 한국과학기술연구원

【영문명칭】 KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

【대표자】 박원훈

【출원인코드】 37500048

【출원인구분】 각급 시험 연구기관

【우편번호】 136-130

【주소】 서울특별시 성북구 하월곡동 39-1

【국적】 KR

【대리인】

【성명】 박장원

【대리인코드】 F055

【전화번호】 02-549-6934

【우편번호】 135-010

【주소】 서울특별시 강남구 논현동 200

【발명자】

【국문성명】 정서영

【영문성명】 JEONG, Seo Young

【주민등록번호】 560310-1019120

【우편번호】 411-372

【주소】 경기도 고양시 일산구 주엽2동 문촌마을 라이프아파트 205-501

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 권익찬

【영문성명】 KWON, Ick Chan

【주민등록번호】 590302-1690820

【우편번호】 139-230

【주소】 서울특별시 노원구 하계동 시영 7 단지아파트 706-704

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 정혜선

【영문성명】 CHUNG, Hesson

【주민등록번호】 611117-2030217

【우편번호】 405-240

【주소】 인천광역시 남동구 만수동 주공아파트 201-1005

【국적】 KR

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.

대리인

박장원 (인)

【수신처】 특허청장 귀하

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 66 면 66,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 0 항 0 원

【합계】 95,000 원

【첨부서류】 1. 요약서, 명세서(및 도면) 각 1통

2. 출원서 부분, 요약서, 명세서(및 도면)을 포함하는 FD부분 1통

3. 위임장(및 동 번역문)

【요약서】

【요약】

본 발명은 세포내로 유전자 DNA 및 생물학적 활성 약물을 전달할 수 있는 비트리글리세라이드 계열 지방유제와 트리글리세라이드 또는 에틸 스테아레이트계 지질미립구 및 그들의 제조방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 비트리글리세라이드 계열 지방유제와 트리글리세라이드 계열 또는 에틸 스테아레이트 지질미립구를 사용하여 세포내로 DNA 와 같은 생물학적 활성 약물을 효과적으로 전달하는 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 지용성 및 소수성 약물을 함유한 스쿠알렌 또는 스쿠알란을 기재로 한 지방유제와 에틸 스테아레이트를 기재로 한 지질미립구 및 그들의 제조방법에 관한 것이다.

【대표도】

도 16

【명세서】

【발명의 명칭】

유전자 또는 약물을 효과적으로 전달하는 지방유제, 지질미립구 및 이들의 제조방법.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 지방유제 기재를 달리해 제조한 유제의 입자크기와 기재로 사용된 기름의 물/기름 계면장력과의 상관관계를 도시한 그래프.

도 2a는 지방유제 기재를 달리해 제조한 유제의 입자 크기와 유화제인 DLPC농도와 상관관계를 도시한 그래프.

도 2b는 트리부티린을 지방유제 기재로 사용해 제조한 지방유제의 크기의 변화와 DLPC농도와의 상관관계를 도시한 그래프.

도 2c는 트리카프로인을 지방유제 기재로 사용해 제조한 지방유제의 크기의 변화와 DLPC농도와의 상관관계를 도시한 그래프.

도 2d는 트리카프릴린을 지방유제 기재로 사용해 제조한 지방유제의 크기의 변화와 DLPC농도와의 상관관계를 도시한 그래프.

도 3a는 트리부티린을 지방유제 기재로 사용해 제조한 지방유제의 크기와 DLPC 및 DNPC, 두가지 종류의 유화제의 농도간의 상관관계를 도시한 그래프.

도 3b는 트리카프로인을 지방유제 기재로 사용해 제조한 지방유제의 크기와 DLPC 및 DNPC, 두가지 종류의 유화제의 농도간의 상관관계를 도시한 그래프.

도 3c는 트리카프릴린을 지방유제 기재로 사용해 제조한 지방유제의 크기와 DLPC

및 DNPC, 두가지 종류의 유화제의 농도간의 상관관계를 도시한 그래프.

도 4. DNA/지질 유전자 전달체 복합체의 전기영동 사진

복합체 형성시 1마이크로 그램의 pCMV-beta 플라스미드와 일정량의 지질 유전자 전달체를 사용하였다.

1 번 줄 : DNA 분자량 표지

2 번 줄 : 1 마이크로 그램의 pCMV-beta 플라스미드 [7164 base pares (bp)]

(이하 모두 1 마이크로 그램)

3 번 줄 : 2 마이크로 리터의 Lipofectamin 용액과 pCMV-beta 플라스미드

4 번 줄 : 4 마이크로 그램의 DOTAP 리포솜과 pCMV-beta 플라스미드

5, 6, 7 그리고 8 번 줄 : 1, 2, 4 그리고 6 마이크로 그램의 DOTAP/스쿠알렌 지방 유제와 pCMV-beta 플라스미드

9 번 줄 : 4 마이크로 그램의 DOTAP/콩기름 지질 유제와 pCMV-beta 플라스미드

10 번 줄 : 4 마이크로 그램의 DOTAP/아마인유 지질 유제와 pCMV-beta 플라스미드

도 5. poly-L-aspartic acid의 지방/pCMV-beta 복합체들에 대한 교환 반응후의 pCMV-beta의 전기영동 사진 ; (가) Lipofectamine and DOTAP 리포솜, (나) 아마인유-유제/ pCMV-beta 복합체, (다) 콩기름-유제/ pCMV-beta 복합체 (라) 스쿠알렌-유제/ pCMV-beta 복합체.

1 번 줄 : DNA 분자량 표지

2 번 줄 : 1 마이크로 그램의 pCMV-beta 플라스미드 [7164 base pares (bp)]

(이하 모두 1 마이크로 그램)

3 번 줄 : 지방 전달체/pCMV-beta 복합체

4 -13 번 줄 : 지방 전달체/pCMV-beta 복합체과 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 25, 50, 100, 200, 400, 그리고 800 등가의 poly-L-aspartic acid(PLLA)을 1 시간 동안 방치 한 후 전기영동.

* 등가 : 전하비 [DNA의 인분자 수 /PLAA의 카르복실기 수 (-/-)] .

도 6. 양이온성지질미립구와 유전자의 복합체 투사전자현미경 사진

(가) pCMV-beta, (나) 트리라우린-유제, (다) 트리라우린-유제/pCMV-beta 복합체 (1/1 질량/질량) 그리고 (라) 트리라우린-유제/pCMV-beta 복합체 (2/1 질량/질량).

도 7. 협력지질 DOPE에 의한 지질 유전자전달체의 형질주입 효율의 증가를 도시한 그래프.

(가) DOTAP/DOPE 리포솜, (나) DOTAP/DOPE 스쿠알렌-지방유제

■: 무 혈청, □: 혈청 80%

도 8. 협력지질 DIOLEIN에 의한 지방유제 유전자전달체의 형질주입 효율의 증가를 도시한 그래프.

■: 무 혈청, □: 혈청 80%

도 9. 비이온성 계면활성제 Tween80의 함량에 따른 지질 유전자전달체의 형질주입 효율의 변화를 도시한 그래프.

(가) DOTAP/DOPE/Tween80 리포솜, (나) DOTAP/DOPE/Tween80 스쿠알렌- 지방유제

■: 무 혈청, □: 혈청 80%

도 10. Tween80 첨가에 따른 지방유제의 안정성 증가를 도시한 그래프.

○ : DOTAP/DOPE 스쿠알렌- 지방유제, : DOTAP/DOPE/Tween80 스쿠알렌- 지방유제

도 11. 프로타민 설페이트 첨가에 따른 지질 유전자전달체들의 형질주입효율의 증가를 도시한 그래프.

(가) 프로타민 설페이트 (나) 4 마이크로그램의 DOTAP/DOPE/Tween80 리포솜와 프로타민 설페이트, (다) 4 마이크로그램의 DOTAP/DOPE/Tween80 스쿠알렌-지방유제와 프로타민 설페이트.

● : 무 혈청, ○ : 혈청 80%

도 12. 다양한 세포주들에서의 지질 유전자 전달체들의 형질주입의 효율을 도시한 그래프.

■ : 무 혈청, □ : 혈청 80%

도 13. 다른 지방유제 기재를 이용하여 제조한 유제에 함유된 리팜피신의 방출속도 차이를 도시한 그래프.

▽ : PBS, ● : 아마씨기름, ○ : 콩기름, ▼ : 스쿠알렌을 기제로 만든 지방유제.

도 14. 다른 지방유제 기재를 이용하여 제조한 유제에 함유된 다이클로페낙의 방출속도 차이를 도시한 그래프.

▽ : PBS, ● : 아마씨기름, ○ : 콩기름, ▼ : 스쿠알렌을 기제로 만든 지방유제.

도 15. DNA 10 마이크로그램 투여시 지방유제 기재의 종류에 따른 혈관주사를 통한 생체내 DNA 전달효율을 비교한 그래프.

도 16. DNA 50 마이크로그램 투여시 지방유제 기재의 종류에 따른 혈관주사를 통한

생체내 DNA 전달효율을 비교한 그래프.

도 17. 지방유제 기재의 종류에 따른 혈관주사를 통한 생체내 DNA 전달효율을 비교한 그래프: PEG 계열 유화제의 영향.

도 18. 지방유제 기재의 종류에 따른 혈관주사를 통한 생체내 DNA 전달효율을 비교한 그래프: 프로타민 설페이트의 영향.

도 19. 다른 지방유제 기재를 이용하여 제조한 유제에 함유된 다이클로페남산의 방출속도 차이를 도시한 그래프.

▽: PBS, ●: 아마씨기름, ○: 콩기름, ▼: 스쿠알렌을 기재로 하여 만든 지방유제.

도 20. 사이클로스포린 함유 에틸 스테아레이트 지질미립구를 동결건조한 후의 전자현미경 사진.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

본 발명은 생체적합하며, 생분해성인 비트리글리세라이드 (non-triglyceride)계열 지방을 이용하여 제조된 유성/수성 (oil-in-water type) 형의 지방유제, 유전자 등의 생리활성물질이나 지용성 또는 양쪽성 약물과 상기 지방유제와의 복합체, 및 그들의 제조방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 생체적합하며, 생분해성인 탄소원자 수 10-18개인 트리글리세라이드 (triglyceride) 또는 에틸 스테아레이트 계열의 고품 지방 (fat)을 이용하여 제조된 유성/수성형의 지질미립구, 유전자 등의 생리활

성물질이나 지용성 또는 양쪽성 약물과 상기 지질미립구와의 복합체, 및 그들을 제조하는 방법에 관한 것이다.

유전자 전달체계로 사용되는 지질입자들의 대표적인 예로는 리포솜과 지방유제들을 들 수 있다. 리포솜을 이용한 유전자요법은 이미 임상적용의 단계에 와 있고 최근 3년간 많은 연구결과가 보고되어 있다. 최근 개발된 트리글리세라이드 계열 지방유제는 유전자와 복합체를 형성했을 때, 혈청 존재 하에서도 복합체의 물리적 안정성이 유지되며, 형질주입효율이 감소하지 않으며 효율적으로 세포내로 유전자를 전달하는 것으로 연구되어 있다 (한국특허출원 제 3022/1997호). 그러나, 이러한 트리글리세라이드 계열 지방유제는 고분자성 지질 (polymeric lipid)을 유화제로 첨가하지 않았을 때에는 안정성에 문제가 있다. 즉, 고분자성 지질의 일종인 1-팔미토일-2-올레오일-*sn*-글라이세로-3-포스포에탄올아민-N-[폴리(에틸렌글리콜)2000] (PEG2000PE)가 없을 때에는 지방유제 자체가 불안정해지며, 형질주입효율 역시 현저히 감소한다. 지방유제에 안정성을 부여하는 폴리에틸렌 글리콜 계열 고분자성 지질로는, PEG2000PE 이외에도 Span, Tween, Brij 등이 있다. 그러나, 이러한 물질들은, 입체장애로 인해 유전자와 지방유제와의 결합을 방해하는 문제점을 가지고 있다. 이와 같은 이유로 고분자성 지질을 유화제로 사용한 양이온성 지방유제는 유전자와 복합체를 형성할 때 +/- 전하 비율로 볼 때 약 3~4 배의 과량이 필요하다. 본 발명에서는 이러한 문제점을 극복하기 위해, 고분자성 지질이 없이도, 또는 최소량의 고분자성 지질을 첨가함으로써 안정한 지방유제를 제조하는 데 그 목적이 있다. 따라서 지방유제의 안정성에 영향을 미치는 여러 가지 인자 중 하나인 지방

유제 기재 (oil core)를 바꾸면서 유제를 제조하였다. 적합한 지방유제 기재를 선정하기 위하여, Sigma Chemical Company의 카탈로그에 나오는 기름중 독성이 낮고, 생체적합한 기름들을 이용하여, 지방유제들을 제조하였다. 그 결과 물과 기름 사이의 계면장력이 클수록 달걀 포스파티딜콜린 (egg PC: egg phosphatidylcholine)을 유화제로 사용하였을 때, 더욱 안정한 지방유제가 형성된다는 놀라운 사실을 발견하게 되었다. 문헌에 따르면, 물/기름 사이의 계면장력과 지방유제의 안정성과의 상관관계에 대한 구체적인 연구 결과는 없으며, 물/기름 사이의 계면장력이 적을수록 안정한 지방유제를 형성할 것이라는 추측만 있었을 뿐이다. 따라서 본 발명자는 지방유제 기재의 물리적 성질과 유제의 안정성과의 상관관계에 대한 체계적 연구를 수행하여 본 발명의 과학적 근거를 부여하고자 하였다.

발명의 과학적 근거를 부여하는 예비 실험: 일반적으로 지방유제는 기름을 유화제와 섞어서 물에 분산시킴으로써 제조된다. 유제를 안정화시키는 원동력이 무엇인지 알아보기 위한 많은 실험들이 이제까지 진행되어 왔고, 많은 이론들이 세워져 왔다. 본 발명자들도, 이러한 유제의 안정화 요인을 알아내기 위한 실험을 실시하던 중, 아주 흥미로운 현상을 발견하게 되었다. 지금까지 발표된 논문 및 특허들을 살펴 본 결과, 지방유제 기재의 물리적 성질 즉, 물과의 계면장력, 친유성 (lipophilicity) 등 유화제 형성시 중요할 것으로 예상되는 물리적 변수와 유제 안정성과의 상관관계에 대한 연구가 미흡함을 발견하였다. 따라서 먼저 이 상관관계를 알아보기 위하여 친유성 또는 계면장력 (interfacial tension)이 다른 오일들을 지방유제 기재로 선정하여 달걀 포스파티딜콜린 (egg PC)를 유화제로 사용하여 유

제를 제조하였다. 표 1에서 보면 Sigma Chemical Company에서 판매하는 여러 가지 오일을 이용하여, 10 %(v/v) 오일 1.2 %(w/v) 달걀 포스파티딜콜린 및 나머지의 물로 구성되는 유제를 1)먼저 달걀 포스파티딜콜린 리포솜을 소니케이션 (sonication)하여 만들고, 2) 이 리포솜 용액에 오일을 넣고 2 분간 세 번에 걸쳐 (총 6 분) 다시 소니케이션시키는 방식으로 제조하여 그 유제의 입자 크기를 측정하였다. 그 결과 아마인유는 가장 입자가 큰 유제를 형성한 반면, 스쿠알렌과 호호바빈 오일은 작은 입자를 가진 유제를 형성하였다. 이렇게 형성된 유제의 입자 크기와 물과 지방유제 기재간의 계면장력을 도 1에 도시하였다. 도 1로부터, 계면장력이 클수록 유화제에 의해 작은 입자를 형성함을 알 수 있다. 이러한 지방유제 기재의 계면장력과 유제 안정성과의 상관 관계에 대한 연구결과는 아직까지 보고된 바가 없다. 도 1에서 사용된 오일들은 스쿠알렌을 제외하고는 여러 트리글리세라이드 및 지방산/알코올 에스테르의 혼합물이다. 따라서, 본 발명자들은 복잡한 혼합물로 이루어진 오일 시스템으로는 유제 안정성과 물리적 상관관계에 대한 연구를 체계적으로 수행하기에는 너무 많은 인자들이 존재한다는 판단 하에, 단일 트리글리세라이드로 이루어진 지방유제 기재 및 단일 포스파티딜콜린으로 이루어진 유화제를 이용하여 유제를 제조하여 유제 안정성과 지방유제 기재의 물리적 상관관계에 대한 연구를 계속하였다. 단일계인 포화 트리글리세라이드를 지방유제 기재로 레시틴 계열중 탄소수가 다른 1,2-디노나노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DNPC: 1,2-dinonanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)과 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DLPC: 1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phospho- choline)을 유화제로 사용

하여, 유제를 제조하였다. DNPC 및 DLPC의 탄화수소 사슬은 각각 9 및 12 개의 탄소로 구성되어 있다. 탄소수가 짧은 DNPC는 DLPC에 비해 친수성이 크며, 더 좋은 유화제이다. 포화 트리글리세라이드로는 트리부티린, 트리카프로인 및 트리카프릴린을 사용했으며 이들은 각각 4, 6 및 8 개의 탄소를 탄화수소 사슬에 가지고 있다. 이들은 탄소수가 커질수록 소수성이 커지며, 물과의 계면장력 또한 커진다. 제조된 유제의 유적 크기 (droplet size)를 측정한 결과를 도 2 및 도 3에 나타내었다. 먼저, 트리부티린, 트리카프로인 및 트리카프릴린을 DLPC를 이용해 유제를 형성한 경우의, 유제의 유적 크기는 트리카프릴린, 트리카프로인, 트리부티린 순서로 커짐을 볼 수 있다. 한편 이 세가지 오일의 소수성 (hydrophobicity)은 역순으로 감소한다. 일반적으로 이제까지 알려진 바에 의하면, 유제의 유적 크기는 오일과 물 사이의 계면장력, 유화제의 친수성-친유성 밸런스값 (HLB: hydrophilicity-lipophilicity balance), 유제 제조방법 등 다양한 인자들에 의해 결정된다고 알려져 있다. 이 실험에서는 다른 물리화학적 인자들을 고정시킨 후 트리글리세라이드의 동종 계열에서만 유제를 제조했으므로 오일의 친유성 또는 물/기름 계면장력만이 유제 안정성을 결정하는 주된 인자이다. 유화제인 DLPC의 농도를 달리하며 트리부티린, 트리카프로인 및 트리카프릴린 지방 유제를 제조한 경우, 친수성이 가장 큰 트리부티린의 경우 유적 크기가 1 마이크로미터 이상인 유제가 형성되었다. 모든 유화제 농도에서 트리카프로인의 경우 트리카프릴린보다 더 큰 유제를 형성하였다. 이는 지방유제 기재의 친유성 (또는 계면장력)이 클수록 작은 입자의 유제를 형성함을 말해준다. 트리부티린의 경우 유제 제조 20일 후 유제의 크기가 증가했음

을 볼 수 있다. 트리카프로인의 경우 역시, 시간이 지남에 따라 유제가 불안정해져서, 유적 크기가 증가함을 볼 수 있다. 여기에서 한가지 특이할 사항은, DLPC를 유화제로 사용했을 경우 그 농도에 관계없이 (1 ~ 24 mg/ml) 유제의 유적 크기가 약 700 ~ 800 nm라는 사실이다. 이는, DLPC가 유화제로 작용을 하지 못함을 말한다. 반면에, 트리카프릴린의 경우 유제는 20일 동안 안정하며, 유화제 농도가 증가함에 따라, 유적 크기가 조금씩 감소하는 전형적인 결과를 보여준다. 다음 도 3a - 3c에서는 각각의 지방유제 기재에 대하여 DNPC (C9:0)와 DLPC (C12:0) 두가지 유화제로 그 농도를 바꾸면서 유제를 제조하고 하루 후에 유적 크기를 측정하였다. 트리부티린과 트리카프로인의 경우 모든 유화제 농도에서 DLPC를 사용했을 때, 큰 입자를 가진 유제가 형성됨을 볼 수 있다. 트리카프로인의 경우, DLPC를 이용했을 때는 입자의 크기가 300 nm가 넘는 유제가 형성되나, DNPC 유화제로는 높은 유화제 농도에서는 200 nm 이하의 크기를 가진 유제가 형성되고 이는 유제의 안정성이 DNPC를 이용했을 때 증가했음을 보여준다. 트리카프릴린의 경우 DNPC나 DLPC등 유화제의 종류에 관계없이 안정된 유제를 형성함을 볼 수 있다. 따라서 이 결과로부터, 소수성이 큰 지방유제 기재는 HLB 값이 낮은 유화제로도 안정한 유제를 형성하지만, 친수성이 큰 지방유제 기재의 경우는 HLB 값이 낮은 유화제가 필요하다는 것을 알 수 있다.

이와 같이, 도 1에서 보았던 현상을 단일 성분의 오일 및 유화제를 이용하여, 적당한 유화제 존재 하에서 물과의 계면장력이 큰 기름들이 안정한 유제를 형성한다는 것을 재확인 할 수 있었다. 따라서 본 발명은 막연하게 '일정한 조성의 기름/

유화제/물이 이루는 유제를 만드는 방법'에 대한 발명이 아니며, 특정한 물리적 성질을 갖는 기름들 (즉 소수성이 크거나 물과의 계면장력이 큰 기름들)이 이루는 유제 및 그 제조방법에 대한 것이다. 본 발명에서 제조한 유제 중 스쿠알렌을 지방유제 기재로 하는 유제는 스쿠알렌의 물과의 계면에서의 높은 계면장력 때문에 아주 안정한 유제를 만든다. 스쿠알렌을 지방유제 기재로 이용해 제조된 유제는 백신 어쥬번트로 널리 쓰이고 있으며, 그에 따르는 많은 특허들이 있다. 예를 들면, 미국특허 5,376,369호는 백신 어쥬번트로 쓰이는 수중유 (oil-in-water (o/w)) 타입의 유제에 관한 것이다. 지방유제 기재로 스쿠알렌 및 스쿠알란을 사용하고 있다. 이때 스쿠알렌을 지방유제 기재로 선정하게 된 것은 독성이 낮고 체내에서 대사가 될 수 있기 때문이다. 또한 다른 발명자에 의해 항암제인 택솔을 포함한 o/w 유제를 만드는 과정에서, 스쿠알렌이 지방유제 기재로 쓰이기도 한다 (미국특허 5,407,683호). 그러나, 이 특허에서 유제를 제조할 때에는 먼저 계면활성제 또는 알코올 등을 이용하여 자기-유화 글래스 (self-emulsifying glass)를 형성한 후 이를 물에 분산시키는 방법으로, 본 발명의 유제와는 기 구성 성분과 제조방법에서 큰 차이가 있다. 다시 부연하자면, 이제까지 여러 연구자에 의해 스쿠알렌을 함유하는 유제가 만들어져 왔으나, 이들은 1) 백신 어쥬번트로 항원을 전달하기 위해 쓰이거나, 2) 본 발명과 다른 조성 및 제조방법으로 택솔을 포함하는 유제였다. 따라서, 본 발명에서처럼 유제의 안정성을 높이기 위한 체계적인 연구 끝에 선정된 것과는 그 과학적 근거부터 차이가 있으며, 결과적으로 제조된 유제를 보더라도 기존의 유제와는 그 조성 및 제조방법과는 차이가 있다.

본 발명은 또한, 에틸 스테아레이트를 기재로 하는 지질미립구에 관한 것이다. 에틸 스테아레이트 역시 스쿠알렌과 같이 트리글리세라이드류보다 물과의 사이에서 높은 계면장력을 가진다. 에틸 스테아레이트, 또는 더욱 넓게 보아 C10-18의 직쇄를 갖는 알코올 및 산의 에틸 에스테르 역시 안정한 지질미립구를 만든다. 이러한 에틸 에스테르를 기재로 한 지질미립구에 대해서는 아직 보고된 바가 없다. 또한 본 발명과는 전혀 다른 조성 및 방법으로 제조된 텍솔을 함유한 스쿠알렌 유제를 제외하고는 스쿠알렌을 기재로 하는 지방유제나 지방산/알코올의 에스테르를 지질미립구 기재로 갖는 약물송달체제로 사용한 보고는 아직까지 없다. 이들 기재들은 지금까지 흔히 쓰이는 피마자, 대두, 잇꽃 (safflower), 해바라기 기름들로부터 제조된 유제에 비해서 월등히 높은 안정성을 보인다. 더욱이, 안정할수록 지용성 약물의 방출속도는 더욱 느려지며, 생체이용성 (bioavailability) 역시 높아진다. 스쿠알렌 및 에틸 스테아레이트 등 친유성 또는 물과의 계면장력이 큰 오일을 기재로 함유한 제제의 안정성은 작은 유적 크기에서 유래한다. 계면장력이 큰 오일이 유화제 존재 하에 안정한 유제를 형성하는 이론적 근거는 명확하지 않으나, 유화제에 의한 장력 구배 형성으로 물과 기름사이의 장력을 효율적으로 낮추어 주기 때문인 것으로 보인다.

본 발명은 스쿠알렌, 스쿠알란 등의 비트리글리세라이드 계열의 기름을 지방유제 기재로 하여 1) 양 전하를 띤 양이온성 계면활성제를 유화제로 사용하는 유제 및 그의 제조방법과 2) 표면전하에 상관없이 유화제로 인지질과 임의로 폴리에틸렌 글리콜이 콘쥬게이트된 지질을 사용하여 지용성 및 양쪽성 약물을 함유한 유제 및 그

것의 제조 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 유전자 및 생물학적 활성약물을 세포 내로 전달하는 양이온성 지질미립구 및 그것의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따라 제공되는 지질미립구는 지방유제와는 달리 내부가 고형이다. 따라서, 급속 동결건조하여 수상을 제거하여도 입자의 크기를 유지할 수 있는 장점이 있다. 지질미립구에 약물을 포함시켜 제조한 후, 동결건조시키면 장시간 보관할 수 있으므로 저장기간을 연장시킬 수 있는 장점이 있다. 양이온성을 띤 지질미립구는 실온 및 체온에서 고체로 존재하는 C12-18의 직쇄를 갖는 트리글리세라이드 및 양이온성 계면활성제를 함유한다. 유전자를 전달하기 위한 양이온성 지질미립구에 대해서는 현재까지 보고된 바가 없다.

지용성 및 양쪽성 약물송달체계로서의 비트리글리세라이드 계열의 유제 및 지질미립구:

트리글리세라이드 계열 유제들은 약물송달체계로서 널리 이용되어왔다. 예를 들면, 올리고펩타이드로서 면역억제제인 사이클로스포린 (cyclosporin)제계로서 지질 유제가 많이 개발되어서, 이에 관한 특허가 여러 건에 달한다. 미국특허 5,660,858에서는 합성된 C8-C12 중간 사슬 길이의 트리글리세라이드 (MCT: medium chain triglyceride)에 사이클로스포린을 용해시켜, 인지질등의 유화제로 분산시킨 o/w 유제 제제 및 그 제조방법이 개시되어 있다. WO 97/35,603에서는 알코올, 알칸올, 폴리소르베이트 80 등에 용해된 후 이를 분산시켜 1 마이크로미터 이하의 입자 크기로 만든 유제가 안정하며 생체이용성도 높다는 것을 보여준다. WO 97/36,610에 의하면, MCT에 녹인 사이클로스포린을 프로필렌 카보네이트를 공동계면활성제로 이

용하여 유제를 만들면, 쉽게 유제를 만들 수 있고, 유제 크기도 100 nm 정도로 조정할 수 있다고 보고하고 있다. 이와 같이 o/w 지질 유제를 이용한 많은 사이클로스포린 유제 제제가 존재하지만, 스쿠알렌이나 스쿠알란과 같은 순수한 고분지성 탄화수소 (pure highly branched hydrocarbon)를 이용한 제제는 보고된바가 없다. 또한 에틸 스테아레이트를 이용한 지질미립구 역시 사이클로스포린의 송달체제로 보고된 바가 없다. 스쿠알렌, 스쿠알란 및 에틸 스테아레이트등의 오일이나 액상 왁스는 단일 구성원이므로 구성성분 및 구성비가 달라지는 식물성 기름 등과 달리 언제나 일정하여, 대량생산시 품질 조절이 용이하다. 또한 쉽게 입자가 작고 안정성이 높은 유제를 형성한다. 더구나 본발명에 의하면, 스쿠알렌을 기재로 가지는 지방유제는 식물성 기름으로 제조된 경우보다 안정성이 월등히 뛰어나고, 입자의 크기도 작다. 또한 리팜피신 (Rifampicin)등의 소수성 약물의 방출속도도 식물성 기름으로 만들어진 유제보다 느리며, 0차 방출속도를 보이는 장점이 있다.

따라서, 스쿠알렌, 스쿠알란, 에틸 스테아레이트 등을 기재로 하는 유제 및 지질미립구는 표면을 양이온 성으로 제조하여, 유전자등과 같이 음전하를 갖는 생물학적 활성물질을 세포에 전달하는 매개체로도 사용할 수 있고, 표면전하에 관계없이, 지용성 및 양쪽성 약물을 기재에 포함시켜, 약물송달체제로도 사용할 수 있다. 특히 암치료 등에는, 양이온성 지방유제 및 지질미립구는 표면에 치료용 유전자를, 내부에는 항암제등의 약물을 포함할 수 있으므로, 그 효용성이 크다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

본 발명의 목적은 생체적합한 물질로 이루어지는 유성/수성형의 지방유제, 지질미

립구 및 그것의 제조방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 목적은 유전자와 같은 생리활성 물질을 효율적으로 전달할 수 있는, 안정한 비트리글리세라이드 계열의 지방유제-생리활성물질 복합체, 트리글리세라이드 또는 에틸 스테아레이트계 지질미립구-생리활성물질 복합체 및 그의 제조방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 목적은 약물을 효과적으로 전달할 수 있는, 스쿠알렌 또는 스쿠알란계 지방유제-약물 복합체, 또는 에틸 스테아레이트계 지질미립구-약물 복합체 및 그의 제조방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또다른 목적은 지방유제를 이용하여 유전자 및 약물을 효율적으로 세포 및 체내로 전달하는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

본 발명의 첫 번째 측면에 따라, (a) 비트리글리세라이드 계열의 1종 이상의 지방유제 기재 2-30%, (b) 양이온성 계면활성제를 포함하는 1종 이상의 유화제 0.01-20%, 및 (c) 나머지를 차지하는 물로 이루어짐을 특징으로 하는, 유전자와 같은 생리활성 물질을 세포내로 전달하기 위한 지방유제가 제공된다. 본 발명의 상기 지방유제에는 기타 첨가제가 추가로 포함될 수 있다. 이 때, 상기 (b) 성분의 유화제는, 얻어진 지방유제가 전달하고자 하는, DNA와 같이 음전하를 띠는 생리활성물질과 복합체를 형성할 수 있도록, 지방유제 표면이 양전하를 띠게 하도록 선택되는 것으로, 양이온성 계면활성제에 덧붙여 비이온성 계면활성제나 인지질, 지방산, 지방 알코올 (fatty alcohol), 담즙산, 또는 콜레스테롤 등이 추가로 사용될 수 있

다.

본 발명의 두 번째 측면에 따라, (a) 탄소 원자수 10-18개인 트리글리세라이드 또는 에틸 스테아레이트로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종 이상의 지질미립구기재 2-30%, (b) 양이온성 계면활성제를 포함하는 1종 이상의 유화제 0.01-20%, (c) 나머지를 차지하는 물로 이루어짐을 특징으로 하는, 유전자와 같은 생리활성 물질을 세포내로 전달하기 위한 지질미립구가 제공된다. 상기 지질미립구에는 기타 첨가제가 추가로 포함될 수 있다. 이 때, 상기 (b) 성분의 유화제는, 얻어진 지질미립구가 DNA와 같이 음전하를 띠는 전달하고자 하는 생리활성물질과 복합체를 형성할 수 있도록, 지질미립구 표면이 양전하를 띠게 하도록 선택되는 것으로, 양이온성 계면활성제에 덧붙여 비이온성 계면활성제나 인지질, 지방산, 지방 알코올 (fatty alcohol), 담즙산, 또는 콜레스테롤 등이 추가로 사용될 수 있다.

본 발명의 세 번째 측면에 따라, (a) 스쿠알렌 또는 스쿠알란과 같은 비트리글리세라이드 계열의 1종 이상의 지방유제 기재 2-30%, (b) 1종 이상의 유화제 0.01-20%, (c) 지용성 및 양쪽성 약물 0.1-10 % 및 (d) 나머지를 차지하는 물로 이루어짐을 특징으로 하는, 지용성 및 양쪽성 약물을 체내로 전달하기 위한 지방유제-약물 복합체가 제공된다. 상기 복합체는 기타 첨가제를 추가로 함유할 수 있으며, 약물을 전달하기 위한 것이므로, 생리활성물질을 전달하기 위한 경우와 달리, 그의 표면전하가 특별히 한정되지 않는다.

본 발명의 네 번째 측면에 따라, (a) 에틸 스테아레이트로 이루어진 지질미립구 기재 2-30%, (b) 1종 이상의 유화제 0.01-20%, (c) 지용성 및 양쪽성 약물 0.1-10 %

및 (d) 나머지를 차지하는 물로 이루어짐을 특징으로 하는, 지용성 및 양쪽성 약물을 체내로 전달하기 위한 지질미립구-약물 복합체가 제공된다. 상기 복합체는 기타 첨가제를 추가로 함유할 수 있으며, 약물을 전달하기 위한 것이므로, 생리활성물질을 전달하기 위한 경우와 달리, 유화제의 종류가 특별히 한정되지 않는다.

본 발명은 또한, 유전자와 같은 생리활성물질을 세포내로 전달할 수 있는 지방유제를 만드는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 지방유제는 양이온성 계면활성제를 포함하는 1종 이상의 유화제 0.01-20%를 물과 혼합하여 수상을 제조하고, 이와같이 얻어진 수상을 비트리글리세라이드 계열의 1종 이상의 지방유제기재 2-30%와 혼합함으로써 제조할 수 있다.

본 발명은 또한 유전자와 같은 생리활성물질을 세포내로 전달할 수 있는 지질미립구를 만드는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 지질미립구는 양이온성 계면활성제를 포함하는 1종 이상의 유화제 0.01-20%를 물과 혼합하여 수상을 제조하고, 이와같이 얻어진 수상을 탄소원자수 10-18개인 트리글리세라이드 또는 에틸 스테아레이트 중에서 선택된 1종 이상의 지질미립구 기재 2-30%와 혼합함으로써 제조할 수 있다.

본 발명은 또한, 지용성 및 양쪽성 약물을 체내로 전달하기 위해 상기 약물이 로딩된 지방유제-약물 복합체를 제조하는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 지방유제-약물 복합체는 먼저, 제 1단계로서 1종 이상의 유화제 0.01-20%를 물과 혼합하여 수상을 제조하고, 제 2단계로서 비트리글리세라이드 계열의 1종 이상의 지방유제 기재 2-30%와 지용성 및 양쪽성 약물 0.1-10%를 혼합한 다음, 제 3 단계로서,

제 1단계에서 제조된 수상과 제 2 단계에서 제조된 유상을 서로 혼합함으로써 제조할 수 있다.

본 발명은 또한, 지용성 및 양쪽성 약물을 체내로 전달하기 위해, 상기 약물이 로딩된 지질미립구-약물 복합체를 제조하는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 지질미립구-약물 복합체는 1종 이상의 유화제 0.01-20%를 물과 혼합하여 수상을 제조하는 제 1단계, 에틸 스테아레이트와 같은 1종 이상의 지질미립구 기재 2-30%와 지용성 및 양쪽성 약물 0.1-10%를 혼합하는 제 2단계, 및 상기 제 1 단계에서 제조된 수상을 제 2 단계에서 제조된 유상과 혼합함으로써 제조할 수 있다.

위 방법과 달리 유상에 유화제, 지용성 및 양쪽성 약물을 완전히 용해 시킨 후, 물로 이루어지는 수상과 혼합하여 지방유제 및 지질미립구를 제조하는 방법도 가능하다.

즉, 양이온성 계면활성제를 포함하는 1종 이상의 유화제 0.01 - 20%를 비트리글리세라이드 계열의 1종 이상의 지방유제 기재 2-30%와 혼합하여 유상을 제조하고, 상기와 같이 제조된 유상을 수상과 혼합함으로써 유전자와 같이 생리활성물질을 세포내로 전달할 수 있는 지방유제를 만들 수 있다.

또한, 양이온성 계면활성제를 포함하는 1종 이상의 유화제 0.01 - 20%를 탄소원자 수 10-18개인 트리글리세라이드 또는 에틸 스테아레이트 중에서 선택된 1종 이상의 지질미립구 기재 2-30%와 혼합하여 유상을 제조하고, 상기와 같이 제조된 유상을 수상과 혼합함으로써 유전자와 같이 생리활성물질을 세포내로 전달할 수 있는 지질미립구를 만들 수도 있다.

또한, 본 발명에 따라, 1종 이상의 유화제 0.01-20%를 비트리글리세라이드 계열의 1종 이상의 지방유제 기재 2-30%, 및 지용성 및/또는 양쪽성 약물 0.1-10%와 혼합하여 유상을 제조한 다음, 상기 얻어진 유상을 수상과 혼합하는 단계로 이루어지는 지용성 및/또는 양쪽성 약물을 체내로 전달하기 위해 상기 약물이 로딩된 지방유제-약물 복합체의 제조방법이 제공된다.

또한, 본 발명에 따라, 1종 이상의 유화제 0.01-20%를 에틸 스테아레이트와 같은 1종 이상의 지질미립구 기재 2-30%, 및 지용성 및/또는 양쪽성 약물 0.1-10%와 혼합하여 유상을 제조한 다음, 상기 얻어진 유상을 수상과 혼합하는 단계로 이루어지는 지용성 및/또는 양쪽성 약물을 체내로 전달하기 위해 상기 약물이 로딩된 지질미립구-약물 복합체의 제조방법이 제공된다.

본 발명에서 유제(에멀전)라 함은 두 개 또는 그 이상의 섞이지 않는 액체가 계면활성제(유화제)에 의해 분산된 입자가 안정화된 불균질한 혼합물이다.

지질미립구(solid lipid nanoparticle, SLN)란 고체상태의 지방 (fat)이 계면활성제(유화제)에 의해 액체에 분산된 입자가 안정화된 불균질한 혼합물이다

본 발명에서 지방유제 기재로 사용되는 비-트리글리세라이드 계열의 기름으로 예를 들어 스쿠알렌, 스쿠알란 등이 사용될 수 있다.

본 발명에서 지질미립구 기재로 사용되는 지방은 예를 들어 C10-18의 직쇄를 갖는 알코올 및 산의 에틸 에스테르, 바람직하게는, 에틸 스테아레이트 등이 사용될 수 있다.

유화제에는 양이온성 계면 활성제외에 인지질 또는 비이온성 계면활성제가 추가로

포함될 수 있다.

유화제로 작용하는 양이온성 계면활성제로는 예를 들어 1,2-다이올레일-3-트리메틸 암모니움 프로판(DOTAP), 다이메틸 다이옥타데실암모니움 클로라이드(DDAB), N-[1-(1,2-다이올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모니움 클로라이드(DOTMA), 1,2-다이올레일-3-에틸포스포콜린 (DOEPC)등이 사용될 수 있다. 양이온성 계면 활성제들은 DNA와의 복합체 형성에 이용될 뿐만 아니라 여분의 양성전하로 세포와 접촉을 촉진시키므로 바람직하다.

인지질은 예를 들어 포스파티딜콜린(PC) 유도체, 포스파티딜에탄올아민(PE) 유도체, 포스파티딜세린(PS) 유도체 등이 사용될 수 있다. 인지질 중에서, L- α -다이올레일 포스파티딜에탄올아민(DOPE)는 형질주입 효율을 상승시키는 중성지질로써 엔도솜(endosome)의 막을 깨뜨려서 유전자를 세포질로 노출시키는 것으로 알려져 있다.

특히 DOPE 및 다이올레인 등의 융해성 지질 (fusogenic lipid)이 유화제로서 추가로 포함될 수 있다. 또한, 유제 및 지질미립구의 안정성을 향상시키기 위해 유화제로서 지방산, 지방 알코올(fatty alcohol), 콜레스테롤, 담즙산 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

비이온성 계면활성제로는 예를 들어 폴록사머, (Poloxamer, Pluronic; 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체, BASF 사 제품), 솔비탄 에스터 (Sorbitan esters, Span), 폴리옥시에틸렌솔비탄 (polyoxyethylene sorbitans, Tween), 폴리옥시에틸렌에테르 (polyoxyethylene ethers, Brij) 계열 등이 사용될 수 있다.

기타 첨가제로는 친수성 고분자 또는 친수성 고분자가 결합된 인지질, 다이아세틸레이티드 인지질 (diacetylated phospholipid)과 같은 중합가능한 인지질이 0.01-10% 추가로 포함될 수 있다. 친수성 고분자로는 예를 들어 폴리옥시에틸렌, 폴리에틸옥사졸린, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 등의 사용될 수 있다. PEG 은 지방유제에 입체구조를 부여하여 지방유제의 안정성을 향상시키며, 또한 PEG 자체가 형질주입 제제로도 사용되므로 형질주입 효과를 증가시킬 수 있다.

기타 첨가제로는 혈액과의 등장성을 유지하기 위하여 추가로 글리세롤, 당, 완충용액 등을 포함할 수 있다.

본 발명의 유제 및 지질미립구는 형질주입 효율을 높이기 위하여, 추가로 폴리에틸렌글리콜 (분자량 500 에서 1000), HA gp 41과 같은 용해성 펩티드 등을 함유할 수 있다.

본 발명의 유제 및 지질미립구는 DNA 등 생체 활성물질을 전달하고자 하는 표적세포로의 표적화를 위해, 추가로 당지질(glycolipid), 리포펩타이드, 항체, 수용체에 대한 리간드, 바이러스성 단백질 등과 같은 표적화 물질을 함유할 수 있다.

본 발명의 유제 및 지질미립구는 DNA등의 응축 (condensation)을 돕기 위해 추가로 프로타민 설페이트 (protamin sulfate), 히스톤 (histone), 및 폴리라이신 (polylysine)과 같은 양성고분자 (polycation)를 함유할 수 있다.

본 발명의 유제 및 지질미립구는 DNA등의 응축을 돕고 지질 담체와 DNA사이의 상호작용을 변화시키기 위해, 일가 또는 다가 음이온을 추가로 함유한다.

본 발명의 지방유제 및 지질미립구를 사용하여 전달하고자 하는 활성물질이 DNA 와

같은 핵산인 경우, 핵산은 음전하를 띠므로 핵산과 결합하기 위해서 운반체는 양전하를 띄어야 하며, 세포내로 들어가기에 적당한 크기를 나타내야 한다.

본 발명의 양전하를 띤 지방유제 및 지질미립구는 내부에 수용성 또는 양쪽성 약물을 포함할 수 있다.

본 발명의 모든 지방유제 및 지질미립구는 수상에 수용성 약물을 추가로 첨가할 수 있다.

그리고 생체내 적용을 고려한다면, 약물을 세포내로 전달할 때 혈청 효과를 반드시 고려해야 한다. 본 발명에서 제조한 지방유제는 혈청이 고농도로 존재하는 경우에도 안정하게 유지되며 또한 높은 정도로 세포내로 형질주입된다.

또한, 본 발명에 따른 DNA와 같은 생물학적 활성 물질을 세포내로 효과적으로 전달하는 지방유제는 (a) 비트리글리세라이드계열의 1종 이상의 지방유제 기재 2-30%를 (b) 유화제 0.01-20% 및 기타 첨가제인 친수성 고분자 또는 친수성 고분자가 결합된 인지질 0.01-10%을 물과 혼합하여 만든 수상과 혼합하는 방법으로 제조할 수도 있다.

또한, 본 발명에 따른 유전자와 같은 생물학적 활성 물질을 세포내로 전달할 수 있는 지질미립구는 (a) 탄소 원자수 10-18개인 트리글리세라이드 또는 에틸 스테아레이트로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종 이상의 지질미립구 기재 2-30%를 녹는점 이상으로 온도를 높인 후 (b) 양이온성 및 비이온성 계면활성제를 포함하는 1종 이상의 유화제 0.01-20% 및 친수성 고분자 또는 친수성 고분자가 결합된 인지질 0.01-10%을 물과 혼합하여 만든 수상의 온도를 지질미립구 기재의 녹는점 이상으로

높여 유상과 수상을 이 온도에서 혼합함으로써 제조할 수도 있다.

본 발명은 또한, 지용성 및 양쪽성 약물을 체내로 전달할 수 있는 지방유제-약물 복합체의 제조방법을 제공하며, 본 발명에 따른 지방유제-약물 복합체는 (a) 지용성 및 양쪽성 약물 0.1-10 %를 비트리글리세라이드 계열의 1종 이상의 지방유제 기재 2-30%에 용해 또는 분산시킨 후 (b) 계면활성제를 포함하는 1종 이상의 유화제 0.01-20% 및 친수성 고분자 또는 친수성 고분자가 결합된 인지질 0.01-10%을 물과 혼합하여 만든 수상과 혼합함으로써 제조할 수 있다.

본 발명은 또한, 지용성 및 양쪽성 약물을 체내로 전달할 수 있는 지질미립구-약물 복합체의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 지질미립구-약물 복합체는 (a) 지용성 및 양쪽성 약물 0.1-10%를 에틸 스테아레이트 2-30%에 에틸 스테아레이트의 녹는점 이상의 온도에서 용해 또는 분산 시킨 후 (b) 계면활성제를 포함하는 1종 이상의 유화제 0.01-20% 및 친수성 고분자 또는 친수성 고분자가 결합된 인지질 0.01-10%을 물과 혼합하여 만든 수상의 온도를 지질미립구 기재의 녹는점 이상으로 높여 유상과 수상을 이 온도에서 혼합함으로써 제조할 수 있다.

위 방법과 달리 유상에 유화제, 지용성 및 양쪽성 약물을 완전히 용해 시킨 후, 물로 이루어지는 수상과 혼합하여 지방유제 및 지질미립구를 제조하는 방법도 가능하다. 즉, 본 발명에 따른 DNA 등의 유전자와 같은 생물학적 활성 물질을 세포내로 효과적으로 전달하는 지방유제는 양이온성 계면활성제를 포함하는 1종 이상의 유화제 0.01 - 20%를 비트리글리세라이드 계열의 1종 이상의 지방유제 기재 2-30%와 혼합하여 유상을 제조하고, 이를, 기타 첨가제인 친수성 고분자 또는 친수성 고분자

가 결합된 인지질 0.01-10%을 물과 혼합하여 만든 수상과 혼합하는 방법으로 제조할 수도 있다.

또한, 본 발명에 따른 DNA 등의 유전자와 같은 생물학적 활성 물질을 세포내로 전달할 수 있는 지질미립구는 양이온성 계면활성제를 포함하는 1종 이상의 유화제 0.01-20%를 탄소 원자수 10-18개인 트리글리세라이드 또는 에틸 스테아레이트로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종 이상의 지질미립구 기재 2-30%와 혼합하여 상기 지질미립구 기재의 녹는점 이상으로 온도를 높여 유상을 제조한 후 이를, 친수성 고분자 또는 친수성 고분자가 결합된 인지질 0.01-10%을 물과 혼합하여 만든 수상의 온도를 지질미립구 기재의 녹는점 이상으로 높여 수상을 얻은 후, 상기 유상과 수상을 이 온도에서 혼합함으로써 제조할 수도 있다.

본 발명은 또한, 지용성 및 양쪽성 약물을 체내로 전달할 수 있는 지방유제-약물 복합체의 제조방법을 제공하며, 본 발명에 따른 지방유제-약물 복합체는 계면활성제를 포함하는 1종 이상의 유화제 0.01-20%와 지용성 및/또는 양쪽성 약물 0.1-10%를 비트리글리세라이드 계열의 1종 이상의 지방유제 기재 2-30%에 용해 또는 분산시켜 유상을 제조한 후 상기 유상을 친수성 고분자 또는 친수성 고분자가 결합된 인지질 0.01-10%을 물과 혼합하여 만든 수상과 혼합함으로써 제조할 수도 있다.

본 발명은 또한, 지용성 및 양쪽성 약물을 체내로 전달할 수 있는 지질미립구-약물 복합체의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 지질미립구-약물 복합체는 계면활성제를 포함하는 1종 이상의 유화제 0.01-20%와 지용성 및/또는 양쪽성 약물 0.1-10%를 에틸 스테아레이트 2-30%에 에틸 스테아레이트의 녹는점 이상의 온도에

서 용해 또는 분산시켜 유상을 만든 후, 친수성 고분자 또는 친수성 고분자가 결합된 인지질 0.01-10%을 물과 혼합하여 만든 수상의 온도를 에틸 스테아레이트의 녹는점 이상으로 높여 유상과 수상을 이 온도에서 혼합함으로써 제조할 수도 있다.

수상의 제조는 지질을 물에 이 분야에서 잘 알려진 방법에 따라 분산시켜 리포솜을 만듦으로서 이루어진다. 유상과 수상과의 혼합은 이 분야에서 잘 알려진 방법에 따라 수행되며, 유상과 수상을 각각 제조하고, 가온하여 용해시킨 후, 이들 두 상을 예를 들어 호모게나이저, 소니케이터, 마이크로플루이다이저 등을 이용하여 혼합한다.

본 발명은 또한 비트리글리세라이드 계열 지방유제 및 포화 트리글리세라이드 계열 또는 에틸 스테아레이트를 기재로 한 지질미립구를 사용하여 세포내로 DNA 등 유전자와 같은 생리학적활성 물질을 효과적으로 전달하는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 또한 비-트리글리세라이드 계열 지방유제 및 에틸 스테아레이트 계열 지질미립구를 사용하여 체내로 양쪽성 및 지용성 약물을 효과적으로 전달하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른, 지방유제 또는 지질미립구에 의해 적혈구, 백혈구, 섬유아세포, 종양세포, 바이러스에 감염된 세포, 상피 세포, 내피 세포, 근육 세포, 간 세포, 내분비선 세포, 신경 세포, 피부 세포, 성 세포, 난자, 정자, 조혈 세포, 태 세포, M 세포, 랑게르한스섬 세포, 거식구, 식물 세포 또는 동물 세포와 같은 표적세포에 생리활성물질을 전달할 수 있다.

본 발명에 따른 약물 전달 방법은 본 발명의 지방유제와 생물학적 활성물질을 결합

하여 표적 세포에 도입시키는 것으로 이루어진다.

본 발명에 따른 지방유제 또는 지질미립구를 약물 또는 생리활성물질 전달시스템으로 적용할 때, 지방유제를 예방, 진단, 치료의 목적으로 정맥 주사, 근육내 주사, 비강내 투여, 피하 주사, 피내 주사, 기관내 투여, 피부로 적용할 수 있다.

본 발명의 지방유제 또는 지질미립구가 로딩할 수 있는 지용성 및/또는 양쪽성 약물로는 항바이러스제, 스테로이드계 소염제(SAID), 비스테로이드계 소염제(NSAID), 항생제, 항진균제, 비타민, 호르몬, 레티노인산, 프로스타글란딘, 프로스타사이클린, 항암제, 항대사제, 축동제(miotics), 콜린작용성 약물, 안드레날린 길항제, 항경련제, 항불안제, 정온제, 항우울제, 마취제, 진통제, 동화성 스테로이드제, 에스트로겐, 프로게스테론, 글리코사미노글리칸, 폴리뉴클레오타이드, 면역억제제, 면역촉진제 중에서 선택되는 것이 특징인 지질미립구-약물 복합체를 들 수 있다.

이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 자세히 설명할 것이나, 본 발명의 범위가 이들 실시예로 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 달걀 포스파티딜콜린을 유화제로 사용한 지방유제의 제조

달걀 포스파티딜콜린 (egg phosphatidylcholine, eggPC)을 12 mg/ml의 농도로 물과 섞고 10 분 이상 방치하여 수화시킨 후, 프로브 타입 소니케이터(High intensity ultrasonic processor, 마이크로프로세서 제어, 600-Watt 모델)로 2분간 초음파 분해 처리하여 리포솜 용액을 제조하였다. 다음 표 1의 구성에 따라 지방유제 기재를 바꾸어가며 각각 10 %(v/v) 리포솜 용액에 넣어 프로브 타입 소니케이터로 2분간 세 번에 걸쳐 (총 6 분) 초음파 분해 처리하여 지방유제를 제조하였다.

3차 증류수로 300배 희석한 후 Malvern Zetasizer로 크기(QELS 방법)를 측정하였다. 제조 후 1 일 및 20 일 후의 상온에서의 유제들의 크기변화를 표1에서 보여준다 (3회 측정한 평균). 표 1에 의하면, 비트리그리세라이드계인, 스쿠알렌을 이용하여 만든 유제가 다른 유제에 비하여 입자의 크기가 작고 안정함을 알 수 있었다. 제조된 지방유제는 실험전까지 4℃에서 보관하였다.

【표 1】

지방유제 기재	크기(nm)	20 일 후 크기 (nm)
피마자유	246.3	290.2
코코넛유	246.3	278.2
옥수숫 기름	261.0	298.7
면실유	263.0	402.8
앵초기름	247.1	418.0
생선기름	247.0	271.3
호호바기름	224.0	236.8
돼지기름	282.7	307.9
아마인유	354.9	-*
올리브유	263.0	306.1
땅콩기름	256.8	341.3
싸플라워기름	283.6	275.9
참기름	263.3	327.8
콩기름	249.7	272.0
스쿠알렌	191.7	216.2
해바라기기름	249.2	280.8
맥아기름	253.2	285.8

* 측정가능 범위 이상으로 입자크기가 증가함.

실시에 2. 지용성(hydrophobicity) 또는 계면장력이 다른 기름들을 지방유제 기재로 갖는 지방유제들의 제조

다음 표 2의 조성에 따라 유상은 다양한 기름 (10%(v/v))을 수상으로는 DOTAP 리포솜 용액을 사용하였다. DOTAP을 24 mg/ml의 농도로 물과 섞고 37°C에서 수화시킨 후 프로브타입 소니케이터로 2분간 초음파 분해 처리하여 리포솜을 형성시킨다. 형성된 리포솜용액에 다양한 기름을 최종 부피의 10%가 되도록 첨가한 후 2분간 3번에 걸쳐 초음파 분해 처리하여 지질 유제를 제조하였다.

형성된 유제들의 크기는 3차 증류수로 300배 희석한 후 Malvern Zetasizer로 크기 (QELS 방법)와 표면전하 (ζ potential)를 측정하였다 (n=3). 그 결과는 표 2에 나타내었다.

【표 2】

	지방유제 기재	크기	표면 전하 (mV)
리포솜		108.5 \pm 45.1	48.4 \pm 8.5
유제 A	아마인유	220.4 \pm 23.1	50.1 \pm 5.4
유제 B	콩기름	204.1 \pm 18.4	57.7 \pm 6.7
유제 C	스쿠알란	168.4 \pm 10.4	
유제 D1	스쿠알렌	157.5 \pm 8.9	64.5 \pm 7.2

지질 유제의 지용성 또는 물/기름 계면장력이 큰 기름을 핵으로 가진 유제일 수록 입자의 크기가 작게 만들어 졌으며 아마인유를 기재로 이용한 유제를 제외하고 모두 200nm 이하로 작은 미립구를 형성하였다. 또한 표면전하는 모두 48.4 \pm 8.5 mV 이상으로 충분한 양전하를 갖는 것으로 나타났다 (3회 측정한 평균 \pm 표준편차). 제조된 지방유제는 실험 전까지 4°C에서 보관하였다.

실시예 3. 혈청에서 다양한 기름을 핵으로 가지는 지방유제들의 안정성

혈청에서의 크기 변화를 통해 리포솜과 각 지방유제 제형의 안정성을 비교하고자 하였다. 실시예 2의 방법에 따라 제조한 지방유제들을 0.5%의 혈청 하에서의 크기 변화를 측정하였다. 측정한 결과는 표 3에 나타내었다.

【표 3】

혈청 하에서의 지방 유전자 전달체의 안정성

	지방유제 기재	크기	
		무혈청	혈청
리포솜		108.5 ± 45.1	295.3 ± 85.9
유제 A	아마인유	220.4 ± 23.1	261.5 ± 12.4
유제 B	콩기름	204.1 ± 18.4	201.3 ± 11.1
유제 D1	스쿠알렌	157.5 ± 8.9	174.0 ± 5.5

저 농도의 혈청 하에서도 리포솜 제형은 2.7 배정도 그 크기가 증가하였으나 유제의 경우에는 뚜렷한 크기의 증가를 관찰 할 수 없었다. 기존 리포솜 운반체와 고분자 운반체의 문제점중의 하나가 운반체-생물학적 활성 물질 복합체가 응집 물을 형성하여 평균적인 크기 및 크기의 분포가 넓어지므로 효율이 급격히 떨어지는 것이었으나, 본 발명의 지방유제는 혈청 하에서도 크기가 변화지 않고 안정하게 유지되어 이러한 문제점을 극복하였다.

실시예 4. 양이온성 지질미립구의 제조

DOTAP을 24 mg/ml의 농도로 물과 섞고 37℃에서 1 시간 이상 방치하여 수화시킨 후, 프로브 타입 소니케이터(High intensity ultrasonic processor, 마이크로프로세서 제어, 600-Watt 모델)로 2분간 초음파 분해 처리하여 리포솜 용액을 제조하였

다. 다음 표 1의 구성에 따라 트리라우린 및 메틸스테아레이트의 지질미립구 기제를 바꾸어가며 온도를 조정하여 약 50℃에서 액체상태로 만든 후 50℃의 리포솜 용액에 각각 10 % (v/v)되게 넣어 프로브 타입 소니케이터로 2분간 세 번에 걸쳐 (총 6 분간) 50℃에서 초음파 분해 처리하여 지방유제를 제조하였다.

3차 증류수로 300배 희석한 후 Malvern Zetasizer로 크기(QELS 방법)를 측정하였다. 3회 측정한 평균을 표 4 에서 보여준다.

제조된 지방유제는 실험전까지 4℃에서 보관하였다.

【표 4】

지질미립구 기제	크기(nm)
트리라우린	181.2 ± 13.2
에틸 스테아레이트	183.2 ± 1.4

실시에 5. 세포 배양 및 플라스미드 DNA 분리

세포 배양

형질주입을 위한 세포주로는 Adherent 세포주인 COS-1 (섬유아세포로부터 유래됨; ATCC CRL 1640) 세포를 주로 사용하였다. 이들 세포주를 각각 10% 소혈청 [FBS(Fetal bovine serum)]이 포함된 DMEM 배지에서 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

플라스미드 DNA 분리

플라스미드 DNA 분리를 위한 균주로는 각각 pCMV-CAT [사이토메갈로바이러스 (citomegalovirus)의 프로모터(promoter)에 의해 클로람페니콜 아세틸 전이효소

(chloramphenicol acetyl transferase)를 암호화하는 플라스미드, Invitrogen, Inc.]과 pCMV-beta [사이토메갈로바이러스 (citomegalovirus)의 프로모터에 의해 베타갈락토시데이즈(β -galactosidase)를 암호화하는 플라스미드, CLONTECH, Inc.]을 갖는 형질주입된 DH5 α -대장균들을 사용하였고, 플라스미드 DNA 분리에는 QIAGEN 키트(LRS)를 이용하였다. LB-앰피실린 고체배지에서 배양한 콜로니로부터 접종균을 얻어 50 μ g/ml 앰피실린이 포함된 LB 액체 배지에 접종한 후 37°C에서 16 시간 동안 진탕 배양하였다. 배양액을 5,000 x g 로 4°C에서 10분간 원심분리하여 세포를 분리하고 10 ml 의 P1 완충용액으로 재현탁시켰다. 다시 10 ml 의 P2 완충용액을 넣고 실온에서 5분간 방치한 후 10ml 의 P3 완충용액을 넣고 얼음에서 20분간 방치하였다. 4°C, 30,000 x g 에서 30분간 원심분리한 후 상층액을, QBT 완충용액으로 평형을 맞춘 QIAGEN-tip 500 에 넣고 30 ml QC 완충용액으로 2번 씻은 후, 5ml QF 완충용액으로 용출시킨 뒤 전체 부피의 0.7배의 아이소프로판올을 넣고 4°C, 20,000 x g 에서 30분간 원심분리하여 DNA 를 침전시켰다. 70% 에탄올로 DNA 를 씻고 공기 중에서 말린 후 증류수에 녹인 다음 UV 스펙트로포토미터로 정량 하여 사용하였다.

실시예 6. 양이온성 지방유제와 DNA 와의 복합체 형성

음 전하를 갖는 DNA와 지방유제 제형의 유전자 전달체계의 복합체의 특성을 알아보기 위해 실시예 2 에서 제조된 유제와, 시판되는 리포솜인 리포펙타민 ①과 DOTAP 으로 만들어진 리포솜을 대조군으로 사용하여, DNA와의 복합체 형성 여부를 실험하였다. 시험관 내에서, 각각 적당량의 운반체(실시예 2의 유제와 리포펙타민①)와

pCMV-beta (1 μ g)를 실온에서 섞어준 뒤 30 분간 실온에서 방치하였다.

1% 아가로스 젤에 이상의 복합체 혼합액을 적재하고, 트리스 아세테이트-EDTA 완충 용액 (pH 8.0)을 통해 전기영동하였다. 전기영동 후 에티움 브로마이드로 30분간 염색하여 DNA-지방유제 복합체를 확인하였다. 그 결과를 도 4 에 나타낸다.

도 4에서 보듯이 2 μ l의 리포펙타민은 1 μ g의 DNA와 복합체를 이루어 아가로스 젤에서 고정화되었다. 지방유제들 역시 리포솜 제형과 동일하게 음전하를 띄고 있는 DNA와 효과적으로 결합하여 복합체를 형성함을 알 수 있다.

실시에 7. 양이온성 지방유제와 DNA 와의 복합체의 PLAA에서의 저항성 검증

음 전하를 갖는 DNA와 지방유제 제형의 유전자 전달체계의 복합체의 특성을 알아보기 위해 실시에 6과 동일한 방법으로 만들어진 복합체들을 폴리-L-아스파르트산 (PLAA: poly-L-aspartic acid)의 농도를 달리하여 처리하였다. 이때 복합체에서 방출되는 DNA의 밴드를 확인함으로써 지방유제에 의해 형성된 지방유제/DNA 복합체의 음전하를 띤 고분자에 대한 저항성을 살펴보았다. 결과는 도 5에 나타내었다. DNA 전하의 대한 등가가 1.25 이상에서 리포펙타민①과 DOTAP의 경우 거의 모든 DNA 가 방출된 것에 비해 지방유제들의 경우 이 보다 640배 높은 등가에서도 DNA와 결합을 유지하였다. 이는 유제 제형이 리포솜 제형보다 강한 DNA/지방 전달체 복합체를 형성함을 가리키며 이러한 형상은 지방유제의 전달체계가 혈청, 점막 등의 생물학적 장벽 하에서 리포솜 제형에 비해 보다 우수한 형질주입 효율을 보일 것으로 생각된다.

실시에 8. COS-1 세포주에서 양이온성 지방유제의 형질주입 효율 분석

시험관 내의 실험에서는 COS-1을 표준으로 하여 형질 주입 효율을 분석하였다. COS-1 세포를 형질주입하기 약 12 시간 전 96 웰(well) 플레이트에 1×10^4 개 접종하였다. 0.5 마이크로그램의 pCMV-beta와 2 마이크로그램의 DOTAP 리포솜과 실시예 2의 지방유제들의 DOTAP 2 마이크로그램을 각각 혈청을 함유하지 않는 DMEM 20 마이크로리터로 희석하였다. 희석된 리포솜과 지방유제 용액을 각각 희석한 DNA 용액에 첨가, 혼합한 후 아래 위로 10번씩 섞어 주고 실온에서 30 분동안 방치하였다. 형질주입할 세포를 혈청을 함유하지 않는 DMEM으로 세척하고, 무 혈청의 DMEM 배지 160 마이크로리터를 첨가한 후 지방-DNA 복합체들을 첨가하였다. 세포 내로 DNA 전달을 위해 1시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후 혈청을 함유하지 않는 DMEM 배지로 세척하여 세포 내로 전달되지 않은 지방/DNA 복합체들을 제거하고, 혈청 10% 가 포함된 배지를 다시 첨가하여 24 시간동안 배양하였다.

형질주입 후 24 시간뒤, 페트리디쉬에서 배지를 제거하고 200 마이크로리터의 PBS로 세포를 씻은 뒤 50 마이크로리터의 용해 용액(lysis solution ; 0.1% Triton X-100, 250 mM Tris, pH8.0)을 첨가한 후 - 70°C에서 냉동시키고 이것을 다시 녹여서 세포들을 완전히 용해시켰다. 각각의 웰에 50 마이크로리터의 0.5%의 우혈청 알부민을 포함하는 PBS용액을 첨가한 뒤 다시 150 마이크로리터의 기질용액(1mg/ml 농도의 클로람페니콜 레드 갈락토피라노사이드)을 상온에서 약 1시간 동안 효소 반응시켰다. 활성은 재조합 β -갈락토시데이즈를 표준으로 하여 상기의 방법과 동일하게 효소 반응시킨 후 570 nm 에서 흡광도를 측정하여 상대적인 값으로 산출하였다(n=3). 형질주입 효율은 이상의 베타-갈락토시데이즈의 활성으로 상대적으로 평

가하고 그 결과를 표 5에 나타내었다.

실시예 9. Cos-1 세포주에서 혈청이 양이온성 지방유제의 형질주입에 미치는 영향

지방유제의 혈청 하에서의 DNA의 세포 내로의 전달능력을 알아보기 위하여, 지방/DNA 복합체들을 첨가하기전 형질주입할 세포를 혈청을 함유하지 않는 DMEM으로 세척하고 혈청을 80% 함유하는 DMEM 배지 160 마이크로리터를 첨가하여 실시예 8의 방법에 따라 형질주입하고 효율을 분석하였다. 이상의 여러 지방유제들의 형질주입 효율 실험 결과는 표 5에 나타내었다.

【표 5】

계면장력이 다른 지방유제 기재를 갖는 지방유제의 형질주입 효율 및 세포독성

	지방유제	형질주입 효율 (mU/well)		세포증식율 (%)
	기재	무혈청	혈청 80 %	
리포솜		0.73 ± 0.13	0.04 ± 0.01	78.4 ± 13.5
유제 A	아마인유	0.22 ± 0.10	0.08 ± 0.02	77.1 ± 12.4
유제 B	콩기름	0.21 ± 0.07	0.12 ± 0.02	85.7 ± 11.7
유제 C	스쿠알란	0.30 ± 0.08	0.18 ± 0.08	85.9 ± 12.2
유제 D1	스쿠알렌	0.37 ± 0.09	0.22 ± 0.07	89.5 ± 10.2

실시예 10. 세포독성실험.

살아 있는 세포를 테트라졸륨 염인 MTT (3-4,5-디메틸티아졸-2-일), 2,5-디페닐 테트라졸륨 브로마이드를 사용하여 정량화할 수 있다. 테트라졸륨 염은 각종 탈수소 효소들에 의해 활성을 나타낸다. 테트라졸륨환은 활성 있는 미토콘드리아를 가지고 있는 살아있는 세포에서만 개환되어 황색의 수용성 테트라졸륨 염료가 보라색의 포

르마잔 생성물로 변환된다. 이 반응은 정량성이 있으므로 스캐닝 멀티웰 분광광도계 (ELISA 판독기)를 사용하여 빠르고 정확하게 살아있는 세포를 정량할 수 있다.

COS-1 세포를 실험하기 하루 전에 1×10^4 세포/웰로 96 웰 플레이트에 접종하였다. 지방유제들을 일정량 취하여 성장 배지로 최종 부피를 200 마이크로리터로 맞춘 후 배지를 제거한 세포에 넣어주었다. 24 시간동안 배양한 후 매질을 제거하였다. PBS 용액으로 2번 세척한 후 새로운 매질 200 마이크로리터와 MTT 용액 50 마이크로리터를 넣어준 다음 알루미늄 호일로 싸서 4시간동안 배양하였다. 매질을 제거한 후 MTT-포르마잔 결정을 DMSO 200 마이크로리터를 넣어 녹였다. 글리신 버퍼를 50 마이크로리터 넣은 후 570 nm 에서 흡광도를 측정하였다 (n=3).

이상의 여러 지방유제들의 세포독성 실험 결과는 표 5에 나타내었다.

지방유제의 형질주입 효율은 리포솜보다 낮았으나, 리포솜 제형의 경우는 혈청 하에서 형질주입효율이 약 18.2배 정도로 감소하였다. 이에 비해 유제 제형들의 경우에는 혈청 하에서의 형질주입효율의 감소정도가 약 1.6에서 2.7 배 정도로 리포솜 제형에 비해 현격히 낮았다. 위의 실험에서는 스쿠알렌/지방유제의 경우, 무 혈청 및 혈청 하에서의 형질주입율이 가장 우수하였다. 이는 스쿠알렌을 핵으로 하는 지방유제의 경우 지방유제의 안정성이 증가하게 되고, 이러한 안정성의 증가로 인해 혈청 하에서도 의미 있는 수준의 형질주입효율을 유지할 수 있었던 것으로 사료된다. 이러한 실험 결과는 혈청 및 점액과 같은 생체내 불안정성 인자가 많은 생체 적용시 지방유제제형의 유전자 전달체계는 보다 안정하게 유전자 전달물질을 세포 내로 전달할 수 있다는 가능성을 제시한다. 또한 표 5에 타난 바와 같이, 지방유제

의 경우는 리포솜에 비해 세포독성이 또한 낮았으며 특히, 스쿠알렌을 핵으로 가진 지방유제의 경우 약 89% 이상의 세포들이 살아있는 것이 관찰되어 가장 낮은 세포 독성을 보였다.

실시에 11. 양이온성 지질미립구와 유전자의 복합체 형성

실시에 4의 트리라우린을 기재로 하는 양이온성 지질미립구와 유전자를 각각 다른 비율로 완충용액 상에서 섞고, 1% 우라닐 아세테이트로 네가티브 염색하여 전자전달 현미경 상에서 50,000배의 배율로 복합체를 관찰하였다 (도 6). 도 6의 사진 C와 D는 양이온성 지질미립구가 사진A의 플라스미드(pCMV-beta)와 결합하여 DNA/지질미립구 복합체를 형성함을 보여주고 있다.

실시에 12. 양이온성 지질미립구를 이용한 형질 주입

실시에 4의 트리라우린을 기재로 하는 양이온성 지질미립구를 이용하여 형질주입한 결과, 무혈청과 혈청 80%에서 베타갈락토시데이즈의 활성이 각각 0.24 ± 0.07 과 0.11 ± 0.02 mU/well이었고, 살아있는 세포 백분율도 82.6 ± 15.6 %로 비교적 세포독성이 낮은 결과를 보였다. 이상의 실험을 통해 고형 핵을 가지는 지방유제를 이용한 형질 주입이 이루어짐으로서, 이들 유제 제형을 이용한 유전자전달체의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

실시에 13. 양이온성 지방유제에 DOPE를 협력지질(helper lipid)로 첨가 했을 때의 형질주입 효율의 증가

협력지질로 DOPE (L- α -다이올레일 포스파티딜에탄올아민)를 사용함으로써 지방유제의 형질주입 효율을 증가시키고자 하였다. 협력 지질들은 상온에서 용해성

(fusogenicity)을 가지는데 이러한 용해성에 의해 DNA/지방 복합체가 세포내의 엔도솜 (endosome)을 뚫고 나오는 것이 용이하게 함으로서 형질주입효율이 증가되는 것으로 알려져 있다.

실시에 2의 스쿠알렌을 핵으로 갖는 지방유제와 리포솜에 DOTAP과 DOPE의 질량 비가 각각 1:0, 11:1, 7:1, 5:1, 3:1, 5:3, 1:1, 1:3 그리고 1:5되는 지방 유전자 전달체를 제조한 후 실시에 8에 따라 형질주입 실험을 실시하였다. 또한 혈청에 대한 영향을 관찰하기 위해 실시에 9와 동일한 방법으로 실험을 실시하였다. 결과는 도 7에 그래프로 나타내었다.

유제와 리포솜의 제형 공히, DOPE의 양이 증가됨에 따라 형질주입효율이 증가되어 질량 비가 5:1에서 최고의 형질주입효율을 나타내었다. 그러나 이보다 높은 DOPE의 농도에서는 형질주입효율이 오히려 감소하는 경향을 보였는데, 이는 일정량 이상의 DOPE의 첨가는 오히려 형질주입에 방해됨을 의미한다. 이러한 DOPE에 의한 형질주입효율의 감소는 과도한 DOPE의 첨가에 의한 전달체와 DNA/지방 복합체의 안정성의 감소 등과 관련이 있을 것으로 사료된다.

실시에 14. 양이온성 지방유제에 다이올레인(DIOLEIN)을 협력지질로 첨가했을 때의 형질주입 효율의 증가

협력지질로 다이올레인을 사용함으로써 지방유제의 형질주입 효율을 증가시키고자 하였다. 다이올레인은 DOPE와는 달리 기존 연구에서 협력지질로서 사용되지 않는 지질이며, 본 특허에서 새로운 협력지질로서의 가능성을 점검하고자 하였다. 실시에 2의 스쿠알렌을 핵으로 갖는 지방유제와 리포솜에 다이올레인을 총 지질량의

10%가 되도록 첨가한 후 실시예 8에 따라 형질주입 실험을 실시하였고, 또한 혈청 하에서의 형질주입 효율에 미치는 영향을 관찰하기 위해 실시예 9와 동일한 방법으로 실험을 실시하였다. 결과는 표 6에 나타내었다.

【표 6】

다이올레인이 DOTAP 매개 형질주입에 미치는 영향

	지방유제 기재	유화제	크기 (nm)	형질주입효율 (mU/well)		세포증식율 (%)
				무혈청	혈청 80%	
리포솜	-	DOTAP	148.5 ±	0.73 ±	0.04 ±	78.4 ±
			44.1	0.13	0.01	13.5
	-	DOTAP/ DIOLEIN	185.2 ±	0.98 ±	0.07 ±	83.4 ±
			21.1	0.12	0.04	14.8
지방유제	스쿠알렌	DOTAP	145.1 ±	0.35 ±	0.20 ±	82.7 ±
			18.4	0.09	0.04	10.4
	스쿠알렌	DOTAP/ DIOLEIN	165.2 ±	0.46 ±	0.22 ±	85.6 ±
			19.2	0.07	0.07	11.1

다이올레인 첨가에 의해 리포솜과 유제의 제형 모두 형질주입 효율이 증가하였다. 흥미롭게도, 다이올레인 첨가에 의해 리포솜의 경우 세포독성이 감소되는 현상이 관찰되었다. 이러한 현상은 DOPE 첨가에 의해 세포독성이 증가하는 현상과는 상반되는 것이다. 이는 다이올레인이 용해 지질 (fusionogenic lipid)인 동시에 생물활성을 조절하는 단백질 키나제 C (protein kinase C)의 활성화제로서 작용할 수 있기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 다이올레인은 기존의 협력지질의 단점을 극복할 수 있는 새로운 협력지질로서의 가능성을 갖는다.

실시에 15. DOPE와 다이올레인의 동시 첨가에 의한 지방유제의 형질주입 효율의 증가 실험

실시에 13과 14의 두 가지의 협력지질을 함께 사용함으로써 형질주입 효율의 상승 효과가 가능한가에 대하여 고찰하기 위해서 DOTAP와 DOPE의 질량비는 5:1로 고정된 후 다이올레인의 양을 변화시키면서 형질주입효율의 변화를 살펴보았다. 실시에 2의 스쿠알렌을 기재로 갖는 지방유제에 DOTAP와 DOPE의 질량합과 다이올레인의 질량비가 각각 1:0, 7:1, 5:1, 3:1, 1:1, 그리고 1:3 되는 지방유제를 제조한 후 실시에 8에 따라 형질주입 실험을 실시하였고, 또한 혈청에 대한 영향을 관찰하기 위해 실시에 9와 동일한 방법으로 실험을 실시하였다. 결과는 도9에 그래프로 나타내었다.

형질주입의 효율은 다이올레인이 증가됨에 따라 증가되었고 질량 비가 5:1에서 최고의 형질주입 효율을 나타내었다. 이러한 사실은 이들 협력지질을 동시에 첨가함으로써 상승효과를 끌어낼 수 있음을 의미한다. 이러한 결과는 다이올레인의 용해성이 DOPE의 용해성 보다 우수한 결과와 다이올레인이 갖는 또 하나의 생물학적 기능, 즉, 단백질 키나제 C (protein kinase C)의 활성 증가 등에 기인 한 것으로 사료된다. 그러나 높은 다이올레인의 농도에서는 형질주입효 율이 오히려 감소하는 경향을 보였는데, 이는 과도한 두 협력지질의 양에 의해 전달체계와 DNA/지방 복합체가 불안전해지는 것 등과 관련이 있을 것으로 사료된다.

폴리에틸렌글리콜 (PEG) 유래의 계면활성제는 지방유제에 대해서 입체 장애를 부여함으로써 유제의 안정성을 증가시키며, 또한 저분자의 PEG의 경우 융합성

(fusionogenicity)의 성질을 가진다. 따라서 본 실험에서는 유제의 혈청 하에서의 안정성과 융합성을 동시에 부여하는 PEG 유래의 비이온성 계면활성제를 선별하고자 하였다.

실시에 16. 폴리에틸렌글리콜(PEG) 구조를 갖는 고분자성 계면활성제 성분에 따른 형질전환 효율 및 세포독성

실시에 13의 DOTAP/DOPE 지방유제에 다양한 분자량을 가지는 폴리에틸렌글리콜 (PEG) 구조를 갖는 고분자성 계면활성제, Tween80, PEG₂₀₀₀PE(1-팔미토일-2-올레오일-sn-글라이세로-3-포스포에탄올아민-N-[폴리(에틸렌글리콜)2000], HC060, 그리고 Pluronic F68을 각각 10, 20, 20, 그리고 50%첨가하여 유제를 제조하여 실시에 8 와 10과 같은 방법으로 형질주입 및 세포독성 실험을 실시하였다. 그 결과는 표 7 에 정리하였다.

Tween80을 첨가한 경우 리포솜과 지방유제의 경우 형질주입 효율이 모두 증가되었으나 그 외 나머지 계면활성제의 첨가는 형질주입 효율을 증가시키지 못하였으며, PEG의 입체장애에 의해 오히려 양이온성 지질인 DOTAP의 DNA 결합능력을 감소시키는 결과를 초래하였다. 그 결과 DNA와의 복합체 형성을 위해 보다 많은 양의 유제가 사용되고 이로 인해 세포독성을 증가시켰다. 따라서 지방유제의 안정성과 형질주입 효율의 증가를 위해서는 적합한 계면활성제의 선택과 적당량의 사용이 바람직한 것으로 사료된다.

【표 7】

제형	비온성 계면활성제 *	DOTAP 량	크기 (nm)	형질주입효율 (mU/well)				세포증식율 (%)
				무혈청		혈청 80%		
리포솜 A	-	2	154.4 ±	0.90 ±	0.08 ±	78.9 ±		
			25.1	0.31	0.01	18.5		
리포솜 B	Tween80	3	145.6 ±	1.51 ±	0.12 ±	76.0 ±		
			12.1	0.28	0.05	11.3		
리포솜 C	PEG2000PE	5	151.41 ±	0.54 ±	0.04 ±	82.0 ±		
			19.4	0.12	0.02	12.3		
리포솜 D	HCO60	5	140.2 ±	0.50 ±	0.06 ±	85.0 ±		
			0.98	0.10	0.02	10.7		
유제 A	-	2	200.1 ±	0.62 ±	0.38 ±	89.3 ±		
			08.7	0.15	0.11	15.4		
유제 B	Tween80	4	186.3 ±	1.05 ±	0.52 ±	79.8 ±		
			13.2	0.18	0.13	18.2		
유제 C	PEG2000PE	8	190.2 ±	0.41 ±	0.23 ±	81.8 ±		
			10.4	0.10	0.09	14.5		
유제 D	HCO60	8	162.0 ±	0.33 ±	0.24 ±	83.2 ±		
			08.9	0.11	0.07	12.3		
유제 E	F68	10	232.2 ±	0.20 ±	0.10 ±	78.3 ±		
			12.3	0.09	0.06	15.7		

* DNA 0.5 마이크로그램이 기준일 때, 복합체 형성에 필요한 유제의 DOTAP량. 지방 유제의 경우와는 달리, 리포솜의 경우 비이온성 계면활성제의 첨가에도 불구하고 여전히 혈청 하에서의 형질전환효율은 감소되었다.

실시에 17. Tween80 첨가량에 따른 형질주입 증가

실시에 16과 동일한 제형에 Tween80의 양을 총 지질의 0, 5, 10, 15 그리고 20 퍼

센트(percent)가 되도록 첨가하여 리포솜과 지방유제의 지방 유전자 전달체계를 제조하여, 실시예 8과 동일한 형질주입 실시하였다. 그 결과는 도 9에 그래프로 나타내었다. 형질주입 효율은 Tween80의 양의 증가와 함께 같이 증가하다가 총 지질의 10%의 Tween80이 첨가된 지방유제의 경우가 가장 우수한 결과를 나타내었다. 그러나 10% 이상의 Tween80이 첨가된 지방유제에서는 오히려 형질주입 효율이 감소되는 경향을 보였다. 이는 고 밀도의 Tween80이 존재하는 지방유제의 경우에는 Tween80의 용해력(fusogenicity) 효과보다는 입체장애(steric hinderance)의 효과가 우세해지는 결과로 생각된다.

실시예 18. Tween80 첨가에 따른 지방유제의 안정성 증가

Tween80의 첨가가 지방유제의 안정성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시예 16의 방법에 따라 제조한 10%의 Tween80이 첨가된 지방유제와 실시예 13의 방법에 따라 제조한 Tween80이 첨가되지 않은 DOTAP/DOPE 지방유제의 안정성을 비교하였다. 이 두 종류의 지방유제를 0.5%의 혈청과 0.1%의 소듐 아자이드 (sodium azide)가 함유된 인산염 완충염수 (PBS:Phosphate buffered saline) 용액에서 300배 희석한 후 해당 시간에 600 nm 에서 흡광도를 측정하였다(n=3). 결과는 초기의 값을 100%로 환산하여 도 10에 그래프로 나타내었다.

Tween80이 첨가된 지방유제의 경우 첨가되지 않은 지방유제에 비해 거의 흡광도가 변화하지 않았다. 이는 Tween80의 첨가로 인해 지방유제의 물리적 안정성이 증가되었음을 시사한다.

실시예 19. 지방유제의 제조에 따른 특성

실시에 16의 비이온성 계면활성제인 Tween 80이 10% 첨가된 지방유제를 각각 마이크로플루다이저 (microfluidizer)와 초음파 분해기 (sonicator)를 이용하여 제조한 후 크기와 형질주입 효율을 비교하였다. 실험 방법은 초음파 분해방법의 경우는 실시에 2의 방법과 동일하나, 마이크로플루다이저를 이용한 경우는 다음과 같다. 두 상을 각각 약 70℃ 정도로 가온하여 성분들을 완전히 가용화시킨 후 유상과 수상을 섞어 호모게나이저로 8000 rpm 에서 10분간 교반하여 지방유제를 제조하고, 이것을 Microfluidizer[®] 로 출구 공기압 80 psi 에서 10번 통과시켜 미세한 지방유제를 얻었다. 크기는 실시에 1과 같이 3차 증류수로 300배 희석한 후 Malvern Zetasizer 로 크기를 측정한 후 실시에 8에 따라 형질주입 하였다. 제조된 지방유제는 실험 전까지 4℃에서 보관하였다. 그 결과를 표 8에 정리하였다.

【표 8】

제법에 따른 지방유제의 특성

제조방법	크기 (nm)	형질전환효율 (mU/well)	
		무혈청	혈청 80%
마이크로플루다이제이션	178.5 ± 12.7	1.10 ± 0.20	0.54 ± 0.14
소니케이션	186.3 ± 13.2	1.05 ± 0.18	0.52 ± 0.13

두 방법으로 제조한 유제들은 크기와 형질주입효율이 모두 유사한 실험결과를 나타내었다. 대량생산을 위해서는 주로 마이크로플루다이제이션을 사용하고, 실험실적으로는 소량생산에 적합한 초음파분해처리를 하게 되는데, 이 두 방법으로 제조된 지방유제의 특성과 생물학적 활성물질 전달능력이 유사한 실험결과를 보였다(n=3).

실시예 20. 프로타민 설페이트(protamine sulfate)의 전처리가 복합체의 크기에 미치는 영향

프로타민 설페이트는 다가양이온성 고분자 (polycationic polymer)로서 음이온 중합체인 DNA와 정전기적으로 결합하여 강한 응축작용을 통해 프로타민/DNA 복합체를 형성한다. 또한 자체에 핵지향서열 (nucleus targetting moiety)을 가짐으로서 복합체의 핵으로의 이동을 촉진하여 형질주입효율을 향상시킬 수 있는 단백질이다.

DNA(pCMV-beta)와 유전자 전달체의 복합체형성시 프로타민 설페이트를 미리 DNA와 복합체를 형성시키는 전처리과정을 걸쳐 지방/프로타민 설페이트/DNA 복합체를 형성하였다. 이러한 전처리과정을 통해 DNA의 음전하를 감소시킴으로서 보다 안정한 복합체를 형성하고자 하였으며, 또한 안정한 복합체를 형성시킴으로서 형질주입효율을 증가시킬 수 있음 확인하고자 하였다.

실시예 6에서와 같이 리피드 유전자전달체계와 DNA의 복합체를 형성하기 15분 전, 프로타민 설페이트를 웰(well) 당 각각 0.5, 1.0, 그리고 1.5 마이크로그램씩 미리 첨가하여 방치하여 프로타민 설페이트와 DNA의 복합체를 형성시켜 준 후 실시예 6에서의 DOTAP 최적량의 절반인 2 마이크로그램을 추가하였다. 크기는 실시예 1와 같이 3차 증류수로 300배 희석한 후 Malvern Zetasizer 로 크기를 측정하였다. 표 9에서 보는 바와 같이 프로타민 설페이트의 전처리에 의해 복합체의 크기가 증가하지 않음을 알 수 있다. 따라서 이상의 전처리는 DNA의 과도한 음전하를 낮추어 줌으로서 복합체형성시 DNA에 의해 야기되는 지방유제의 불안전성을 극복하여 안정적인 복합체의 형성이 이루어짐을 알 수 있었다. 또한 복합체 형성시 지방 전

달체의 사용량을 줄일 수 있어 실시예 16에서의 유제사용량의 증가에 의한 세포독성 문제를 극복할 수 있을 것으로 생각된다.

【표 9】

제 형	지 질	DNA	프로타민 설페이 트	크기 (nm)
리포솜	DOTAP/DOPE	-	-	108.5 ± 15.1
	DOTAP/DOPE	+	-	174.2 ± 08.9
	DOTAP/DOPE	+	+	100.2 ± 06.9
	DOTAP/DOPE/Tween80	-	-	120.4 ± 13.1
	DOTAP/DOPE/Tween80	+	-	138.4 ± 10.1
	DOTAP/DOPE/Tween80	+	+	112.2 ± 04.9
지방유제	DOTAP/DOPE	-	-	121.1 ± 05.1
	DOTAP/DOPE	+	-	179.4 ± 05.9
	DOTAP/DOPE	+	+	119.2 ± 03.9
	DOTAP/DOPE/Tween80	-	-	130.9 ± 04.9
	DOTAP/DOPE/Tween80	+	-	163.5 ± 05.5
	DOTAP/DOPE/Tween80	+	+	125.4 ± 03.9

실시예 21. 프로타민 설페이트 첨가에 의한 형질주입 효율의 증가

실시예 20과 동일한 방법으로 프로타민 설페이트를 전처리 한 후 실시예 8에 따라 형질주입 실험을 실시하였다. 또한 혈청에서의 형질주입 효율을 살펴보기 위해서 실시예 9에 따라 실험하였다. 결과는 도 11에 그래프로 나타내었다. 지방 전달체

와 프로타민 설페이트만으로 형질주입한 경우에는 매우 낮은 형질주입 효율을 보인 반면 프로타민 설페이트를 지방 유전전달체와 함께 형질주입한 경우에는 효율이 매우 높이 증가하였다. 이러한 효율의 증가는 상승적인 것으로 지방 전달체와 프로타민 설페이트만의 효율의 합보다 약 7-10 배이상 증가한 값이다. 가장 우수한 형질주입 효율은 지방유제와 리포솜의 경우 모두 프로타민 설페이트의 양이 1.0 마이크로그램일때 였다.

흥미로운 사실은 프로타민 설페이트를 이용한 형질주입시에도 리포솜의 경우에는 혈청에서는 현격한 형질주입 효율의 감소되는 것에 비해 지방유제의 경우에는 혈청에서도 상당한 활성을 유지하는 것으로 관찰되었다. 따라서 프로타민 설페이트와 지방유제를 함께 이용함으로써 형질주입 효율의 증가, 세포독성의 감소 그리고 혈청의 불활성에 대한 저항성 등의 장점을 얻을 수 있음을 알 수 있었다.

실시에 22. 다양한 세포주들의 형질주입 효율 분석

DOTAP/DOPE/Tween80 지방 전달체의 형질주입효율을 다양한 세포주를 대상으로 분석하였다. 형질주입을 위한 세포주로서 COS-1 대신에 CV-1와 NIH3T3을 사용한 점을 제외하고는 실시에 8의 방법과 동일하게 형질주입하고 효율을 분석하였다. 결과년도 12에 그래프로 나타내었다.

이상의 결과에서 지방유지 유전자 전달체는 다양한 세포주에 대해서 형질주입 능력을 가지고 있음을 관찰하였다.

실시에23. 리팜피신(rifampicin)을 함유한 스쿠알렌계 지방유제의 제조

내부 유상으로 표 10의 기름 1g에 달걀 포스파티딜콜린과 PEG2000PE를 각각 100mg,

80mg씩 첨가한 후 55℃로 가온하여 녹인다. 유화제가 녹은 후 가온상태에서 리팜피신을 10mg 첨가하여 녹인다. 유화제와 약물을 녹인 지방기재에 PBS 10ml을 여러번으로 나누어 넣으면서 프로브 타입 소니케이터로 2분씩 초음파 분해 처리하여 지방유제를 제조하였다. 이 지방유제를 3차 증류수로 300배 희석한 후 크기를 측정하였다 (표 10).

【표 10】

내부 지방 기재	유제크기(nm)
아마씨기름(linseed oil)	226.5±3.12
콩기름(soybean oil)	218.1±2.83
스쿠알렌(squalene)	224.0±3.28

실시에 24. 스쿠알렌계 지방유제를 이용한 리팜피신 방출 실험

리팜피신 방출 실험은 실시에 23에서 제조한 지방유제 3ml을 투석막 백에 넣고 양쪽을 클로저로 묶은 후 10ml의 PBS에 담가 와동수조 (37℃)에서 방출시킴으로써 수행하였다. 비교예로서 지방유제 형태가 아닌 PBS에 용해되어 있는 리팜피신의 방출도 같은 방법으로 실험하였다. 방출된 약물의 농도는 형광법으로 정량하였다.

도 13에 나타낸 바와 같이 스쿠알렌을 기재로 한 경우 가장 방출속도가 느리며, 0차 함수적으로 방출됨을 보인다. 불안정한 아마씨기름이나 콩기름을 이용한 유제에 함유된 리팜피신은 스쿠알렌 제제에 비해 방출속도가 빠르나, 모든지방유제의 경우 비교예인 PBS에 용해된 형태의 리팜피신에 비해 지속적인 약물 방출을 보여주었다.

실시에 25. 다이클로페낙 소듐(diclofenac sodium)을 함유한 스쿠알렌계 지방유제의 제조

실시에 23에서 약물을 리팜피신 대신 다이클로페낙 소듐을 3mg 사용한 것을 제외하고는 실시에 23과 동일하게 지방유제를 제조하였다. 이 지방유제를 3차 증류수로 300배 희석한 후 크기를 측정하였다 (표 11).

【표 11】

내부 지방 기재	유제크기(nm)
아마씨기름(linseed oil)	210.0 ± 0.61
콩기름(soybean oil)	222.5 ± 2.39
스쿠알렌(squalene)	235.8 ± 0.36

실시에 26. 스쿠알렌계 지방유제를 이용한 다이클로페낙 소듐 방출 실험

다이클로페낙 소듐 방출 실험은 실시에 25에서 제조한 지방유제를 이용하여 실시에 24와 동일한 방법으로 수행하였다. 방출된 약물의 농도는 고성능 액체 크로마토그래피법(HPLC)으로 정량하였다(도 14).

다이클로페낙 소듐은 리팜피신에 비해 수용액에 잘 녹는 약물이므로 전체적인 약물 방출이 빠르게 일어났다. 리팜피신의 약물방출 실험에서와 마찬가지로 지방유제의 경우 비교예인 PBS에 용해된 형태의 다이클로페낙 소듐에 비해 지속적인 약물 방출을 보여주었다. 실시에 24와 같이 불안정한 아마씨기름이나 콩기름을 이용한 유제에 함유된 다이클로페낙 소듐은 스쿠알렌 제제에 비해 방출속도가 빠르나, 모든 지방유제의 경우 비교예인 PBS에 용해된 형태의 리팜피신에 비해 지속적인 약물 방출

을 보여주었다.

실시에 27. 치사량 측정

실시에 2의 방법에 따라 제조한 지방 유제 중 스쿠알렌을 기재로 하는 유제를 이용하여 치사량 (LD₅₀)을 측정하였다. 중량 약 30g인 Balb/C 마우스 6마리에 유제를 1/2, 1/4, 1/8 및 1/16배 희석하여 200 마이크로리터 씩 꼬리를 통해 정맥주사하여 24시간 후 쥐의 생존률 (survival rate)를 관찰하였다. 각 희석 배수당 DOTAP 및 스쿠알렌 함량 및 생존율을 표 12에 나타내었다. 따라서 LD₅₀는 약 1.6 g/kg인 것으로 추정된다.

【표 12】

희석배수	DOTAP 함량 (mg)	스쿠알렌 함량 (mg)	생존율 (%)
1/2	2.4	8	402
1/4	1.2	4	16.6
1/8	0.6	2	66.6
1/16	0.3	1	100

실시에 28. 혈관주사를 통한 전신경로 (systemic) 전달의 관찰 (생체내 실험)

생체내에서의 형질주입율을 알아보기 위하여 혈관주사를 통한 전신전달 (systemic delivery)을 실시하였다. 실시에 2의 방법에 따라 제조한 지방 유제 1.7 마이크로리터와 pCMV-luc + 10 μ g의 복합체를 형성시킨 후 약 30 g 정도의 무게를 갖는 Balb/C 마우스의 꼬리에 복합체를 정맥주사하였다. 비교예로 같은 양의 DNA를 DOTAP 리포솜/DNA 복합체와 naked DNA 형태로 주사하였다. 약 22시간 후 마우스의 각 장기 (간, 폐, 신장, 비장)를 분리하였다. 분리된 각 장기를 분쇄한 후 루시페

라제 (luciferase) 활성을 분석하였다. 루시페라제의 활성 분석은 Promega사의 프로토콜에 따랐다. 이를 간략히 설명하면, 각 장기를 적출한 후, 조직의 밀리그램 당 4 마이크로리터의 세포 용해 완충액에서 고속 호모지나이저로 분쇄하고, 두차례 동결-해동 사이클을 거쳤다. 각 추출물은 10,000g에서 2분간 원심분리하여 상등액을 취한 후 -20℃에서 보관하였다. 루시페라제 분석을 위해 10 마이크로리터를 취해 100 마이크로리터의 루시페라제 분석 완충액에 녹인 후 루미노미터 (luminometer)를 이용하여 상대적인 광 유닛 (light unit)을 측정하였다. 도 15에서 보듯이 본 발명 유제인 스쿠알렌을 기재로 하는 지방유제의 DNA 전달효율이 생체내에서, 특히 폐에서 월등히 높음을 관찰하였다.

실시예 29. 혈관주사를 통한 전신경로 전달 관찰 (생체내 실험)

실시예 28과 같은 방법으로 생체내에서의 형질주입율을 알아보기 위하여 혈관주사를 통한 전신경로 전달을 실시하였다. 실시예 16과 달리, 실시예 2의 방법에 EK라 제조한 지방 유제 10.5 마이크로리터와 pCMV-luc + 50 μ g의 복합체를 형성시킨 후 약 30 g 정도의 무게를 갖는 Balb/C 마우스의 꼬리에 복합체를 정맥주사하였다. 비교예로 같은 양의 DNA를 DOTAP 리포솜/DNA 복합체와 naked DNA 형태로 주사하였다. 약 22시간 후 마우스의 각 장기 (간, 폐, 신장, 비장)를 분리하였다. 분리된 각 장기를 분쇄한 후 루시페라제 (luciferase) 활성을 분석하였다. 도 16에서 보듯이 본 발명의 유제인 스쿠알렌을 기재로 하는 지방유제의 DNA 전달효율이 생체내에서, 특히 폐에서 DOTAP 리포솜에 비해 100배 이상 높은 것으로 관찰되었다.

실시예 30. 혈관주사를 통한 전신경로 전달 관찰 (생체내 실험): PEG 계열 유화제

의 영향

실시에 28과 같은 방법으로 생체내에서의 형질주입율을 알아보기 위하여 혈관주사를 통한 전신경로 전달을 실시하였다. 실시에 18의 방법에 EK라 제조한 지방 유제와 pCMV-luc + 10 μ g를 최적비로 복합체를 형성시킨 후 체중 약 30 g의 Balb/C 마우스의 꼬리에 복합체를 정맥주사하였다. 비교예로서 각 유제와 같은 조성의 유화제로 이루어진 리포솜을 이용하여 DNA와 복합체를 형성한 후 정맥주사하여 비교하였다. 약 22시간 후 마우스의 각 장기 (간, 폐, 신장, 비장)를 분리한 후 루시페라제 활성을 분석하였다. 도 17에서 보듯이 DOTAP/DOPE 및 DOTAP/DOPE/Tween 80을 유화제로 사용했을 경우, 본 발명의 지방유제가 리포솜에 비해 높은 루시페라제 활성을 보이며, 특히 DOTAP/DOPE/Tween 80 유제의 경우 DNA 전달효율이 생체내에서, 특히 폐에서 높음을 관찰하였다.

실시에 31. 혈관주사를 통한 전신경로 전달 관찰 (생체내 실험): 프로타민 설페이트의 영향

실시에 28과 같은 방법으로 생체내에서의 형질주입율을 알아보기 위하여 혈관주사를 통한 전신경로 전달을 실시하였다. 프로타민 설페이트 30 마이크로그램과 pCMV-luc + 10 μ g를 섞고 15분간 인큐베이션한 후 실시에 18의 방법에 따라 제조한 지방 유제를 실시에 21의 방법에 따라 일정량 첨가하여 복합체를 형성시킨 후 체중 약 30g의 Balb/C 마우스의 꼬리에 복합체를 정맥주사하였다. 약 22시간 후 마우스의 각 장기 (간, 폐, 신장, 비장)를 분리한 후 루시페라제 활성을 분석하였다. 도 18에서 보듯이 DOTAP/DOPE 및 DOTAP/DOPE/Tween 80을 유화제로 사용했을 경우,

프로타민 설페이트를 첨가했을 경우 DNA 전달효율이 생체내에서 높음을 관찰하였다.

실시에 32. 다이클로페남산을 함유한 스쿠알렌 지방 유제의 제조.

약물로서 리팜피신 대신 다이클로페남산 (diclofenamic acid) 3 mg 사용한 것을 제외하고 실시에 23과 동일한 방식으로 지방유제를 제조하였다. 이 지방유제를 3차 증류수로 300배 희석한 후 크기를 측정하고 그 결과를 다음 표 13에 나타내었다.

【표 13】

내부 지방 기재	유제 크기 (nm)
아마씨기름(linseed oil)	213.2 ± 3.03
콩기름 (soybean oil)	240.1 ± 1.14
스쿠알렌 (squalene)	239.0 ± 1.23

실시에 33. 스쿠알렌을 기재로 하는 지방유제를 이용한 다이클로페남산의 방출실험

다이클로페남산 방출실험은 실시에 32에서 제조한 지방유제를 이용하여 실시에 24와 동일한 방법으로 수행하였다. 방출된 약물의 농도는 고성능 액체 크로마토그래피법 (HPLC)으로 정량하였다 (도 19).

다이클로페남산은 다이클로페낙 소듐에 비해 지용성이 큰 약물이다. 스쿠알렌 제제의 경우 불안정한 아마씨기름이나 콩기름을 이용한 유제에서보다 지속적인 약물방출을 보여준다.

실시에 34. 사이클로스포린을 함유한 에틸 스테아레이트 지질 미립구의 제조

내부 유상으로 에틸 스테아레이트 1g에 계란 포스파티딜콜린과 PEG 2000 PE를 각각

100mg, 80 mg씩 첨가한 후 55℃로 가온하여 녹인다. 유화제가 녹은 후 가온상태에서 사이클로스포린을 20 mg 첨가하여 녹인다. 유화제와 약물을 녹인 지방기재에 PBS 10 ml를 여러번에 나누어 넣으면서 프로브 타잎 소니케이터로 2분씩 초음파 분해처리하여 지방유제를 제조하였다. 이 지방유제를 3차 증류수로 300배 희석한 후 크기를 측정하였다. 결과를 표 14에 나타내었다. 비교예로서 실시예 23에서 약물을 리팜피신 대신 사이클로스포린 20 mg 사용한 것을 제외하고 실시예 23과 동일하게 콩기름을 기재로 한 지방유제를 제조하였다.

【표 14】

종류	유제크기 (nm)
아마인유 지방유제	199.6 ± 2.6
콩기름 지방유제	200.5 ± 0.7
에틸 스테아레이트 지질미립구	180.1 ± 0.7

실시예 35. 사이클로스포린을 함유한 에틸 스테아레이트 지질미립구의 동결건조

실시예 34의 에틸 스테아레이트 지질미립구를 동결건조하여 전자현미경 상에서 그 모양을 관찰하였다. (도 20). 이렇게 건조된 지질미립구를 물에 재분산하여 크기를 측정한 결과 ~500 nm대인 것으로 관찰되었다.

【발명의 효과】

본 발명의 지방유제는 시험관에서 뿐 아니라, 생체 내에서도 안정한 상태를 유지할 수 있으며, DNA 등의 유전자를 비롯한 생리활성물질과 약물을 표적 세포로 효과적으로 전달할 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

(a) 비트리글리세라이드 계열의 기름으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종 이상의 지방유제 기재 2-30%, (b) 양이온성 계면활성제를 포함하는 1종 이상의 유화제 0.01-20%, 및 (c) 나머지를 차지하는 물로 이루어지는 지방유제.

【청구항 2】

(a) 탄소 원자수 12-18개인 트리글리세라이드 또는 에틸 스테아레이트 중에서 선택되는 1종 이상의 지질미립구 기재 2-30%, (b) 양이온성 계면활성제를 포함하는 1종 이상의 유화제 0.01-20%, 및 (c) 나머지를 차지하는 물로 이루어지는 지질미립구.

【청구항 3】

(a) 스쿠알렌, 스쿠알란 또는 이들의 혼합물 중에서 선택되는 지방유제 기재 2-30%, (b) 1종 이상의 유화제 0.01-20%, (c) 지용성 및 양쪽성 약물 0.1-10 % (d) 나머지를 차지하는 물로 이루어지는 지방유제-약물 복합체.

【청구항 4】

(a) 에틸 스테아레이트로 이루어진 지질미립구기재 2-30%, (b) 1종 이상의 유화제 0.01-20%, (c) 지용성 및 양쪽성 약물 0.1-10 % (d) 나머지를 차지하는 물로 이루어지는 지질미립구-약물 복합체.

【청구항 5】

1 종 이상의 유화제 0.01-20%을 물과 혼합하는 수상을 제조하는 제 1단계;

제 1단계에서 제조된 수상을 비트리글리세라이드로 구성되는 군에서 선택되는 1 종 이상의 지방유제 기재 2-30%과 혼합하는 것으로 이루어지는 제 2단계:
로 구성되는 지방유제의 제조방법.

【청구항 6】

1 종 이상의 유화제 0.01-20%을 물과 혼합하는 수상을 제조하는 제 1단계;
제 1단계에서 제조된 수상을 탄소 원자수 12-18개인 트리글리세라이드 또는 에틸 스테아레이트로 이루어진 그룹에서 선택되는 1종 이상의 지질미립구 기재 2-30%와 혼합하는 것으로 이루어지는 제 2단계:
로 구성되는 지질미립구의 제조방법.

【청구항 7】

1종 이상의 유화제 0.01-20%을 물과 혼합하는 수상을 제조하는 제 1단계; 스쿠알렌, 스쿠알란 또는 이들의 혼합물로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상의 지방유제 기재 2-30%와 지용성 및 양쪽성 약물 0.1-10%을 혼합하는 것으로 이루어지는 제 2단계; 제 1단계에서 제조된 수상을 제 2 단계에서 제조된 유상과 혼합하는 것으로 이루어지는 제 3단계;
로 구성되는 지방유제-약물 복합체의 제조방법.

【청구항 8】

1 종 이상의 유화제 0.01-20%을 물과 혼합하는 수상을 제조하는 제 1단계; 제 1단계에서 제조된 수상을 에틸 스테아레이트로 이루어진 그룹에서 선택되는 1 종 이상의 지질미립구 기재 2-30%와 지용성 및 양쪽성 약물 0.1-10 %을 혼합하는 것으로

이루어지는 제 2단계; 제 1단계에서 제조된 수상을 제 2 단계에서 제조된 유상과 혼합하는 것으로 이루어지는 제 3단계;

로 구성되는 지질미립구-약물 복합체의 제조방법.

【청구항 9】

제 1항에 있어서, 친수성 고분자 또는 친수성 고분자가 결합된 인지질을 0.01-10% 추가로 포함하는 지방유제.

【청구항 10】

제 1항에 있어서, (a) 성분인 비트리글리세라이드계 지방유제 기제가 스쿠알렌 또는 스쿠알란인 것이 특징인 지방유제.

【청구항 11】

제 1항, 제 9항, 또는 제 10항에 있어서, 유화제가 인지질 또는 음이온성 계면활성제를 추가로 포함하는 지방유제.

【청구항 12】

제 1항에 있어서, 상기 양이온성 계면활성제가 1,2-다이미리스토일-3-트리메틸암모늄 프로판(DMMAP), 1,2-다이팔미토일-3-트리메틸암모늄 프로판(DPTAP), 1,2-디스테아로일-3-트리메틸암모늄 프로판(DSTAP), 1,2-다이올레일-3-트리메틸암모늄 프로판(DOTAP), 1,2-다이미리스토일-3-다이메틸암모늄 프로판(DMDAP), 1,2-다이팔미토일-3-다이메틸암모늄 프로판(DPDAP), 1,2-다이라우로일-3-다이메틸암모늄 프로판 (DLDAP), 1,2-다이라우로일-3-트리메틸암모늄 프로판 (DLTAP), 1,2-디스테아로일-3-다이메틸암모늄 프로판(DSDAP), 1,2-다이올레일-3-다이메

틸암모늄 프로판(DODAP), 다이메틸 다이옥타데실암모늄 브로마이드(DDAB) 및 N-[1-(2,3-다이올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTMA), 1,2-다이올레일-3-에틸포스포콜린 (DOEPC)으로 구성되는 군에서 선택되는 지방유제.

【청구항 13】

제 1항, 제 9항 또는 제 10항에 있어서, 상기 지방유제가 글리세롤, 또는 용해성 펩티드 또는 용해성 단백질을 함유하는 지방유제.

【청구항 14】

제 13항에 있어서, 용해성 펩티드가 폴리에틸렌글리콜 (분자량 500 에서 1000) 또는 HA gp 41인 것이 특징인 지방유제.

【청구항 15】

제 9항에 있어서, 상기 친수성 고분자가 폴리옥시에틸렌, 폴리에틸옥사졸린 및 폴리에틸렌글리콜로 구성되는 군에서 선택되는 지방유제.

【청구항 16】

제 11항에 있어서, 상기 유화제 중 인지질이 포스파티딜콜린(PC) 유도체, 포스파티딜에탄올아민(PE) 유도체 및 포스파티딜세린(PS) 유도체, 다이아세틸레이티드 인지질과 같은 중합가능한 지질로 구성되는 군에서 선택되고, 상기 비이온성 계면활성제가 폴록사머, (Poloxamer, Pluronic; 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체), 솔비탄 에스터 (Sorbitan esters, Span), 폴리옥시에틸렌솔비탄 (polyoxyethylene sorbitans, Tween), 폴리옥시에틸렌에테르 (polyoxyethylene

ethers, Brij) 계열로 구성되는 군에서 선택되는 지방유제.

【청구항 17】

제 11항에 있어서, 상기 유화제가 L- α -다이올레일 포스파티딜에탄올아민(DOPE) 또는 다이올레인 (diolein), 지방산, 지방 알코올 (fatty alcohol), 콜레스테롤을 또는 담즙산을 포함하는 지방유제.

【청구항 18】

제 2항에 있어서, 친수성 고분자 또는 친수성 고분자가 결합된 인지질을 0.01-10% 추가로 포함하는 지질미립구.

【청구항 19】

제 2항에 있어서, 유화제가 인지질 또는 음이온성 계면활성제를 추가로 포함하는 지질미립구.

【청구항 20】

제 2항에 있어서, 상기 양이온성 계면활성제가 1,2-다이미리스토일-3-트리메틸암모니움 프로판(DMMAP), 1,2-다이팔미토일-3-트리메틸암모니움 프로판(DPTAP), 1,2-다이스테아로일-3-트리메틸암모니움 프로판(DSTAP), 1,2-다이올레일-3-트리메틸암모니움 프로판(DOTAP), 1,2-다이미리스토일-3-다이메틸암모니움 프로판(DMDAP), 1,2-다이팔미토일-3-다이메틸암모니움 프로판(DPDAP), 1,2-다이스테아로일-3-다이메틸암모니움 프로판(DSDAP), 1,2-다이라우로일-3-다이메틸암모니움 프로판 (DLDAP), 1,2-다이라우로일-3-트리메틸암모니움 프로판 (DLTAP), 1,2-다이올레일-3-다이메틸암모니움 프로판(DODAP), 다이메틸 다이옥타데실암모니움 브로마이드(DDAB) 및

N-[1-(2,3-다이올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTMA), 1,2-다이올레일-3-에틸포스포콜린 (DOEPC)으로 구성되는 군에서 선택되는 지질미립구.

【청구항 21】

제 2항에 있어서, 상기 지질미립구가 글리세롤 또는 용해성 펩티드 또는 용해성 단백질질을 함유하는 지질미립구.

【청구항 22】

제 21항에 있어서, 용해성 펩티드가 폴리에틸렌글리콜 (분자량 500 에서 1000) 또는 HA gp 41인 것이 특징인 지질미립구.

【청구항 23】

제 18항에 있어서, 상기 친수성 고분자가 폴리옥시에틸렌, 폴리에틸옥사졸린 및 폴리에틸렌글리콜로 구성되는 군에서 선택되는 지질미립구.

【청구항 24】

제 19 항에 있어서, 상기 유화제 중 인지질이 포스파티딜콜린(PC) 유도체, 포스파티딜에탄올아민(PE) 유도체 및 포스파티딜세린(PS) 유도체, 다이아세틸레이티드 인지질과 같은 중합가능한 지질로 구성되는 군에서 선택되고, 상기 비이온성 계면활성제가 폴록사머, (Poloxamer, Pluronic; 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체), 솔비탄 에스터 (Sorbitan esters, Span), 폴리옥시에틸렌솔비탄 (polyoxyethylene sorbitans, Tween), 폴리옥시에틸렌에테르 (polyoxyethylene ethers, Brij) 계열로 구성되는 군에서 선택되는 지질미립구.

【청구항 25】

제 2항에 있어서, 상기 유화제가 L- α -다이올레일 포스파티딜에탄올아민(DOPE), 다이올레인 (diolein), 지방산, 지방 알코올 (fatty alcohol), 콜레스테롤, 또는 담즙산을 포함하는 지질미립구.

【청구항 26】

제 3항에 있어서, 친수성 고분자 또는 친수성 고분자가 결합된 인지질을 0.01-10% 추가로 포함하는 지방유제-약물 복합체.

【청구항 27】

제 3항에 있어서, 유화제가 인지질 또는 음이온성 계면활성제를 추가로 포함하는 지방유제-약물 복합체.

【청구항 28】

제 3항에 있어서, 유화제가 인지질인 지방유제-약물 복합체.

【청구항 29】

제 28항에 있어서, 유화제가 양이온성, 음이온성, 또는 중성 인지질인 지방유제-약물 복합체.

【청구항 30】

제 3항에 있어서, 상기 지방유제-약물 복합체가 글리세롤 또는 용해성 펩티드 또는 용해성 단백질을 함유하는 지방유제-약물 복합체.

【청구항 31】

제 30항에 있어서, 용해성 펩티드가 폴리에틸렌글리콜 (분자량 500 에서 1000) 또

는HA gp 41인 것이 특징인 지방유제-약물 복합체.

【청구항 32】

제 26항에 있어서, 상기 친수성 고분자가 폴리옥시에틸렌, 폴리에틸옥사졸린 및 폴리에틸렌글리콜로 구성되는 군에서 선택되는 지방유제-약물 복합체.

【청구항 33】

제 28항에 있어서, 상기 인지질이 포스파티딜콜린(PC) 유도체, 포스파티딜에탄올아민(PE) 유도체 및 포스파티딜세린(PS) 유도체, 다이아세틸레이티드 인지질과 같은 중합가능한 지질로 구성되는 군에서 선택되고, 상기 비이온성 계면활성제가 폴옥사머, (Poloxamer, Pluronic; 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체), 솔비탄 에스터 (Sorbitan esters, Span), 폴리옥시에틸렌솔비탄 (polyoxyethylene sorbitans, Tween), 폴리옥시에틸렌에테르 (polyoxyethylene ethers, Brij) 계열로 구성되는 군에서 선택되는 지방유제-약물 복합체.

【청구항 34】

제 3항에 있어서, 상기 유화제가 L- α -다이올레일 포스파티딜에탄올아민(DOPE), 다이올레인 (diolein), 지방산, 지방 알코올 (fatty alcohol), 콜레스테롤, 또는 담즙산을 포함하는 지방유제-약물 복합체.

【청구항 35】

제 3항에 있어서, 지용성, 양쪽성 약물이 항바이러스제, 스테로이드계 소염제 (SAID), 비스테로이드계 소염제 (NSAID), 항생제, 항진균제, 비타민, 호르몬, 레티노인산, 프로스타글란딘, 프로스타사이클린, 항암제, 항대사제, 축동제 (miotics),

콜린작동성 약물, 안드레날린 길항제, 항경련제, 항불안제, 정온제, 항우울제, 마취제, 진통제, 동화성 스테로이드제, 에스트로겐, 프로게스테론, 글리코사미노글리칸, 폴리뉴클레오타이드, 면역억제제, 면역촉진제 중에서 선택되는 것이 특징인 지방유제-약물 복합체.

【청구항 36】

제 35항에 있어서, 항바이러스제가 디클로페낙 소듐 또는 디클로페남산인 지방유제-약물 복합체.

【청구항 37】

제 35항에 있어서, 면역억제제가 사이클로스포린 A인 지방유제-약물 복합체.

【청구항 38】

제 3항에 있어서 지방유제의 수상부분에 추가로 수용성 약물을 포함하는 지방유제-약물 복합체.

【청구항 39】

제 4항에 있어서, 친수성 고분자 또는 친수성 고분자가 결합된 인지질을 0.01-10% 추가로 포함하는 지질미립구-약물 복합체.

【청구항 40】

제 4항에 있어서, 유화제가 인지질 또는 음이온성 계면활성제를 추가로 포함하는 지질미립구-약물 복합체.

【청구항 41】

제 4항에 있어서, 유화제가 인지질인 지질미립구-약물 복합체.

【청구항 42】

제 41항에 있어서, 유화제가 양이온성, 음이온성, 또는 중성 인지질인 지질미립구-약물 복합체.

【청구항 43】

제 4항에 있어서, 상기 지질미립구-약물 복합체가 글리세롤 또는 용해성 펩티드 또는 용해성 단백질을 함유하는 지질미립구-약물 복합체.

【청구항 44】

제 43항에 있어서, 용해성 펩티드가 폴리에틸렌글리콜 (분자량 500 에서 1000) 또는 HA gp 41인 것이 특징인 지질미립구-약물 복합체.

【청구항 45】

제 39항에 있어서, 상기 친수성 고분자가 폴리옥시에틸렌, 폴리에틸옥사졸린 및 폴리에틸렌글리콜로 구성되는 군에서 선택되는 지질미립구-약물 복합체.

【청구항 46】

제 41항에 있어서, 상기 인지질이 포스파티딜콜린(PC) 유도체, 포스파티딜에탄올아민(PE) 유도체 및 포스파티딜세린(PS) 유도체, 다이아세틸레이티드 인지질과 같은 중합가능한 지질로 구성되는 군에서 선택되고, 상기 비이온성 계면활성제가 폴옥사머, (Poloxamer, Pluronic; 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체), 솔비탄 에스터 (Sorbitan esters, Span), 폴리옥시에틸렌솔비탄 (polyoxyethylene sorbitans, Tween), 폴리옥시에틸렌에테르 (polyoxyethylene ethers, Brij) 계열로 구성되는 군에서 선택되는 지질미립구-약물 복합체.

【청구항 47】

제 4항에 있어서, 상기 유화제가 L- α -다이올레일 포스파티딜에탄올아민(DOPE), 다이올레인 (diolein), 지방산, 지방 알코올 (fatty alcohol), 콜레스테롤, 또는 담즙산을 포함하는 지질미립구-약물 복합체.

【청구항 48】

제 4항에 있어서, 지용성 및/또는 양쪽성 약물이 항바이러스제, 스테로이드계 소염제 (SAID), 비스테로이드계 소염제 (NSAID), 항생제, 항진균제, 비타민, 호르몬, 레티노인산, 프로스타글란딘, 프로스타사이클린, 항암제, 항대사제, 축동제 (miotics), 콜린작용성 약물, 안드레날린 길항제, 항경련제, 항불안제, 정온제, 항우울제, 마취제, 진통제, 동화성 스테로이드제, 에스트로겐, 프로게스테론, 글리코사미노글리칸, 폴리뉴클레오타이드, 면역억제제, 면역촉진제 중에서 선택되는 것이 특징인 지질미립구-약물 복합체.

【청구항 49】

제 48항에 있어서, 항바이러스제가 디클로페낙 소듐 또는 디클로페남산인 지질미립구-약물 복합체.

【청구항 50】

제 49항에 있어서, 면역억제제가 사이클로스포린 A인 지질미립구-약물 복합체.

【청구항 51】

제 4항에 있어서 지질미립구의 수상부분에 추가로 수용성 약물을 포함하는 지질미립구-약물 복합체.

【청구항 52】

제 1항, 9항 또는 10항에 따른 지방유제와 DNA, RNA, 안티센스 핵산, 라이보솜, 폴리뉴클레오타이드, 및 올리고뉴클레오타이드 중에서 선택되는 생리활성물질과의 지방유제-생리활성물질 복합체.

【청구항 53】

제 52항에 있어서, 상기 복합체가 생리활성물질을 전달하고자 하는 표적세포로의 표적화를 위해, 추가로 당지질(glycolipid), 리포펩타이드, 항체, 수용체에 대한 리간드 및 바이러스성 단백질로 구성되는 군에서 선택되는 표적화 물질을 포함하는 것이 특징인 지방유제-생리활성물질 복합체.

【청구항 54】

제 52항 또는 53항에 있어서, 상기 복합체가 프로타민 설페이트, 히스톤, 및 양이온성 폴리머 중에서 선택된 물질을 추가로 함유하는 지방유제-생리활성물질 복합체.

【청구항 55】

제 54항에 있어서, 양이온성 폴리머가 폴리라이신인 지방유제-생리활성물질 복합체.

【청구항 56】

제 52항에 있어서, 일가 및 다가 이온을 가진 염을 추가로 함유하는 지방유제-생리활성물질 복합체.

【청구항 57】

제 53항에 있어서, 상기 표적세포가 적혈구, 백혈구, 섬유아세포, 종양세포, 바이러스에 감염된 세포, 상피 세포, 내피 세포, 근육 세포, 간 세포, 내분비선 세포, 신경 세포, 피부 세포, 성 세포, 난자, 정자, 조혈 세포, 태 세포, M 세포, 랑게르한스섬 세포, 거식구, 식물 세포 또는 동물 세포인 지방유제-생리활성물질 복합체.

【청구항 58】

제 52항에 있어서, 상기 복합체가 정맥 주사, 근육내 주사, 비강내 투여, 피하 주사, 피내 주사, 기관내 투여 또는 피부로 적용되는 것이 특징인 지방유제-생리활성물질 복합체.

【청구항 59】

제 1항에 따른 유제를 DNA 또는 생물학적 활성물질을 표적세포 전달하기 위해 사용하는 방법.

【청구항 60】

제 52항에 있어서, 추가로 지용성 또는 양쪽성 약물을 내부기재에 포함하는 것이 특징인 지방유제-생리활성물질 복합체.

【청구항 61】

제 60항에 있어서, 내부기재에 포함되는 약물이 항암제인 지방유제-생리활성물질 복합체.

【청구항 62】

제 2항 또는 30항에 따른 지질미립구와 DNA, RNA, 안티센스 핵산, 라이보솜, 폴리뉴클레오타이드, 및 올리고뉴클레오타이드 중에서 선택되는 생리활성물질과의 지질

미립구-생리활성물질 복합체.

【청구항 63】

제 62항에 있어서, 상기 복합체가 생리활성물질을 전달하고자 하는 표적세포로의 표적화를 위해, 추가로 당지질(glycolipid), 리포펩타이드, 항체, 수용체에 대한 리간드 및 바이러스성 단백질로 구성되는 군에서 선택되는 표적화 물질을 포함하는 것이 특징인 지질미립구-생리활성물질 복합체.

【청구항 64】

제 62항 또는 63항에 있어서, 상기 복합체가 프로타민 설페이트, 히스톤, 및 양이온성 폴리머 중에서 선택된 물질을 추가로 함유하는 지질미립구-생리활성물질 복합체.

【청구항 65】

제 64항에 있어서, 양이온성 폴리머가 폴리라이신인 지질미립구-생리활성물질 복합체.

【청구항 66】

제 62항에 있어서, 일가 및 다가 이온을 가진 염을 추가로 함유하는 지질미립구-생리활성물질 복합체.

【청구항 67】

제 63항에 있어서, 상기 표적세포가 적혈구, 백혈구, 섬유아세포, 종양세포, 바이러스에 감염된 세포, 상피 세포, 내피 세포, 근육 세포, 간 세포, 내분비선 세포, 신경 세포, 피부 세포, 성 세포, 난자, 정자, 조혈 세포, 태 세포, M 세포, 랑게르

한스섬 세포, 거식구, 식물 세포 또는 동물 세포인 지질미립구-생리활성물질 복합체.

【청구항 68】

제 62항에 있어서, 상기 복합체가 정맥 주사, 근육내 주사, 비강내 투여, 피하 주사, 피내 주사, 기관내 투여 또는 피부로 적용되는 것이 특징인 지질미립구-생리활성물질 복합체.

【청구항 69】

제 62항에 있어서, 추가로 지용성 또는 양쪽성 약물을 내부 기재에 포함하는 것이 특징인 지질미립구-생리활성물질 복합체.

【청구항 70】

제 69항에 있어서 내부 기재에 포함되는 약물이 항암제인 지질미립구-생리활성물질 복합체.

【청구항 71】

제 5항에 있어서, 수상에 친수성 고분자 또는 친수성 고분자가 결합된 인지질을 0.01 - 10% 추가로 포함시키는 것이 특징인 지방유제의 제조방법.

【청구항 72】

제 6항에 있어서, 수상에 친수성 고분자 또는 친수성 고분자가 결합된 인지질을 0.01 - 10% 추가로 포함시키는 것이 특징인 지질미립구의 제조방법.

【청구항 73】

제 7항에 있어서, 수상에 친수성 고분자 또는 친수성 고분자가 결합된 인지질을

0.01 - 10% 추가로 포함시키는 것이 특징인 지방유제-약물 복합체의 제조방법.

【청구항 74】

제 8항에 있어서, 수상에 친수성 고분자 또는 친수성 고분자가 결합된 인지질을

0.01 - 10% 추가로 포함시키는 것이 특징인 지질미립구-약물 복합체의 방법.

【청구항 75】

제 5항 또는 71항에 있어서, 유화제를 수상과 혼합하지 않고 지방유제 기재와 혼합하는 것이 특징인 지방유제의 제조방법.

【청구항 76】

제 6항 또는 72항에 있어서, 유화제를 수상과 혼합하지 않고 지질미립구 기재와 혼합하는 것이 특징인 지질미립구의 제조방법.

【청구항 77】

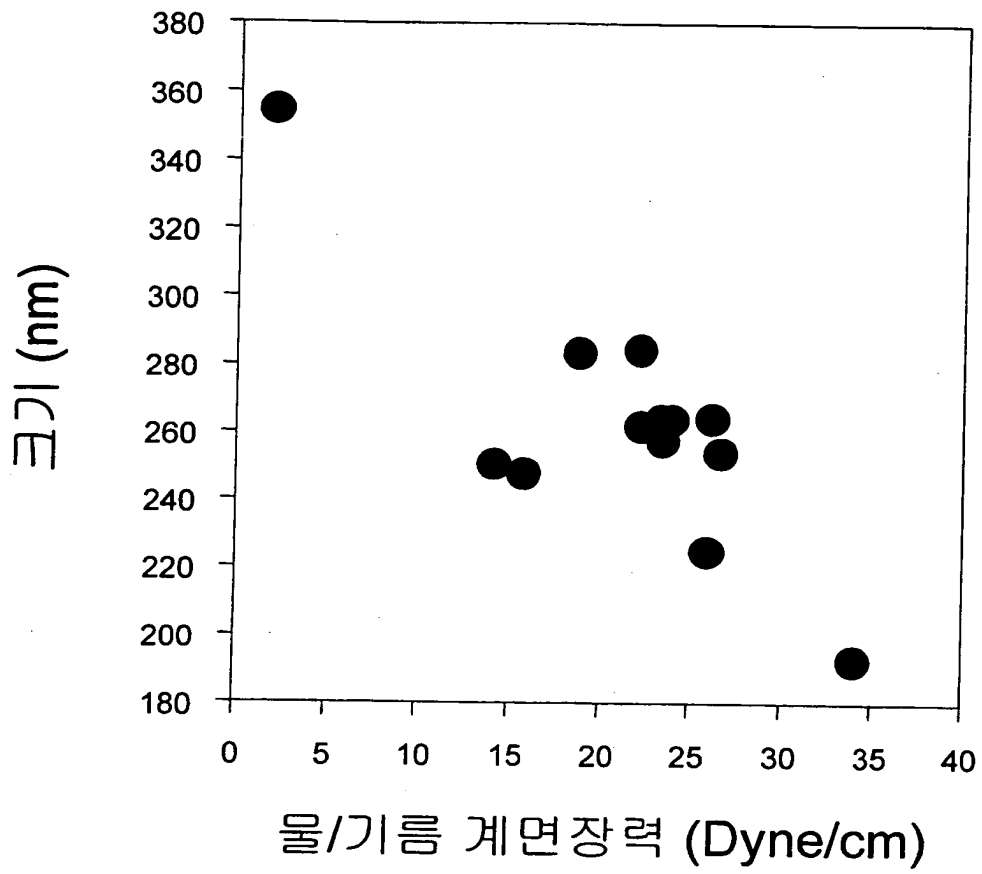
제 7항 또는 73항에 있어서, 유화제를 수상과 혼합하지 않고 지방유제 기재와 혼합하는 것이 특징인 지방유제-약물 복합체의 제조방법.

【청구항 78】

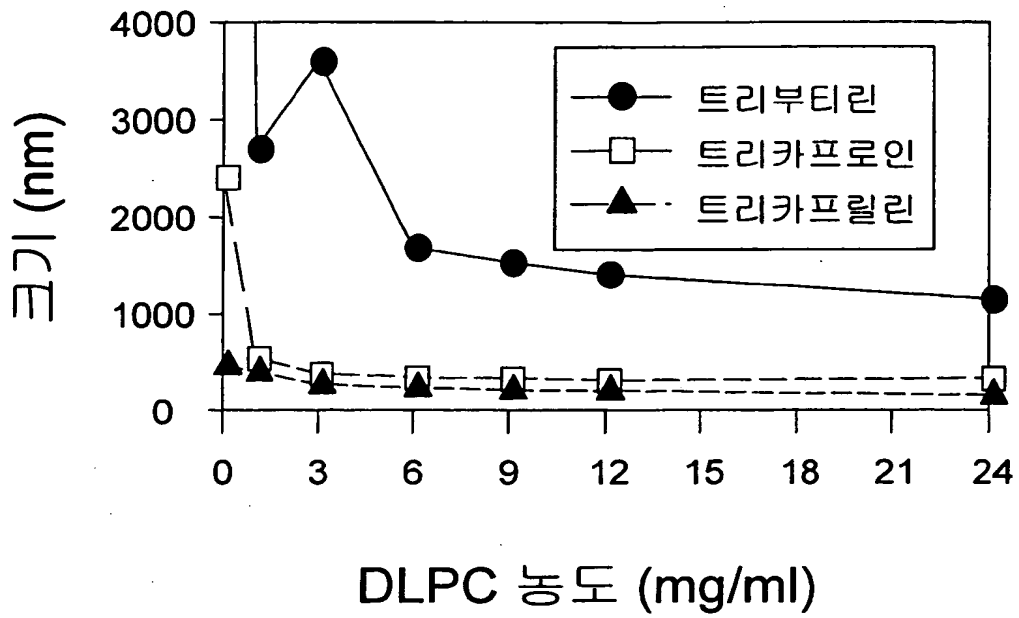
제 8항 또는 74항에 있어서, 유화제를 수상과 혼합하지 않고 지질미립구 기재와 혼합하는 것이 특징인 지질미립구-약물 복합체의 제조방법.

【도면】

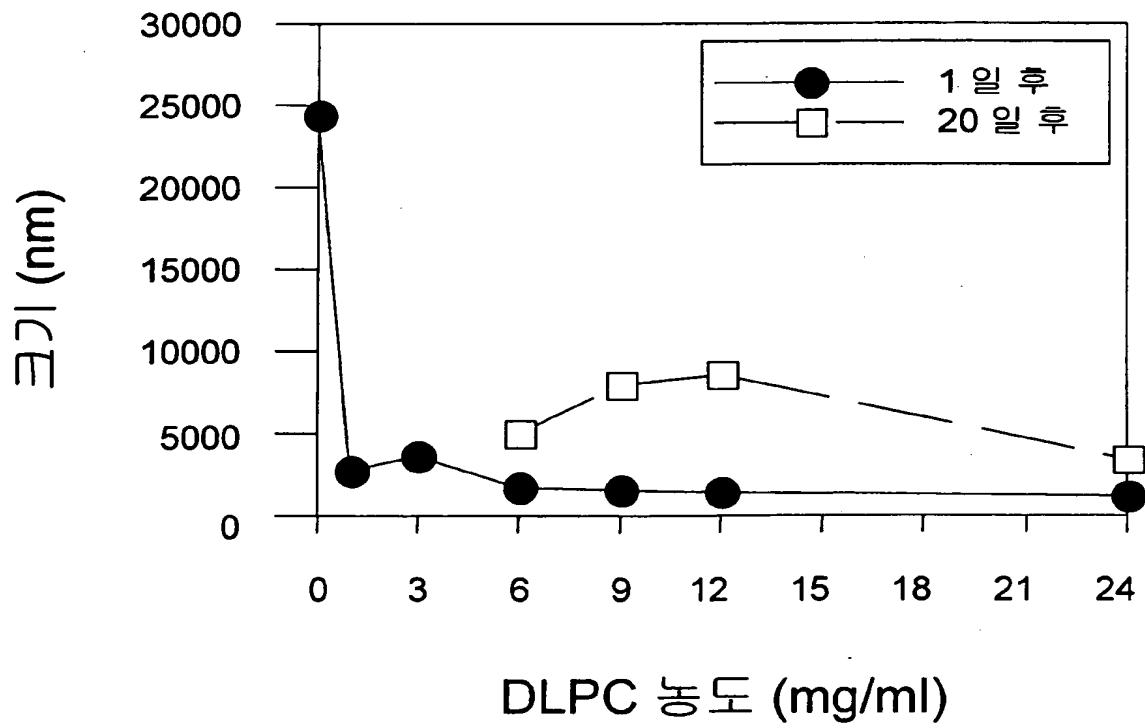
【도 1】



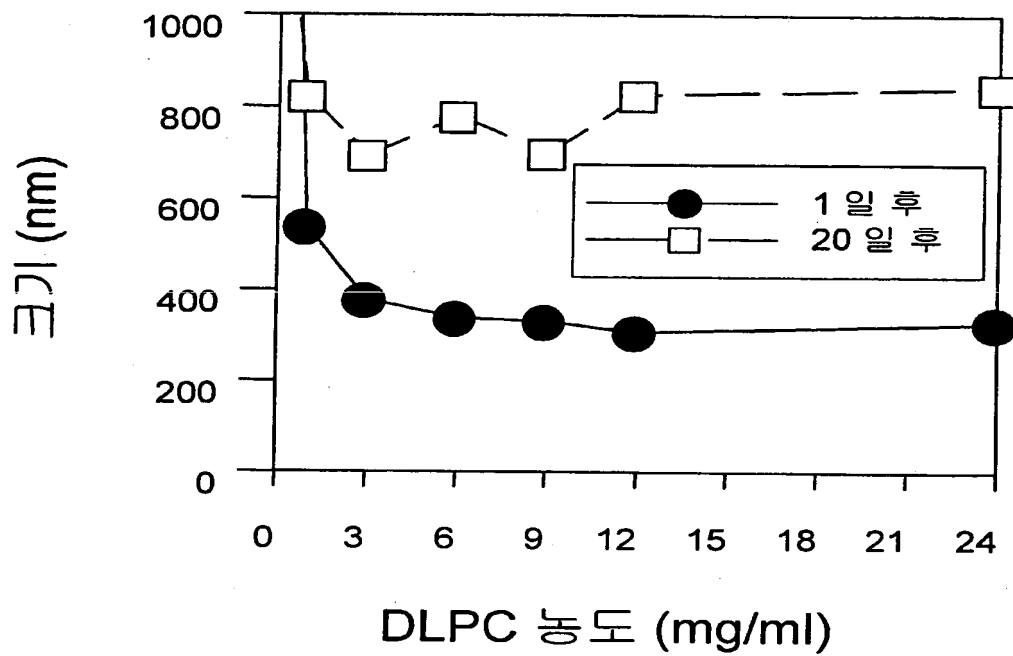
【도 2a】



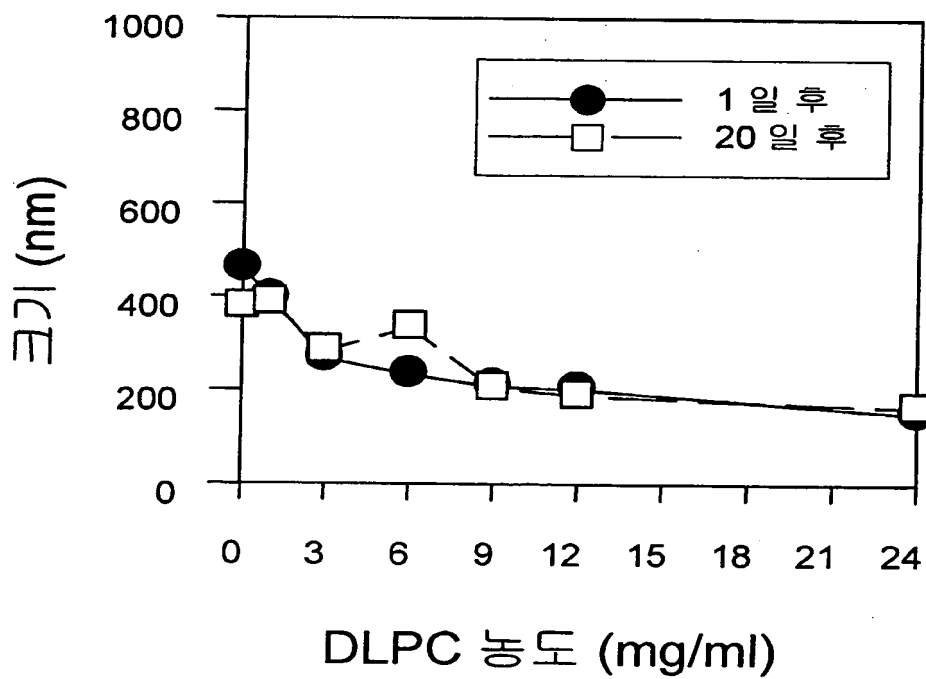
【도 2b】



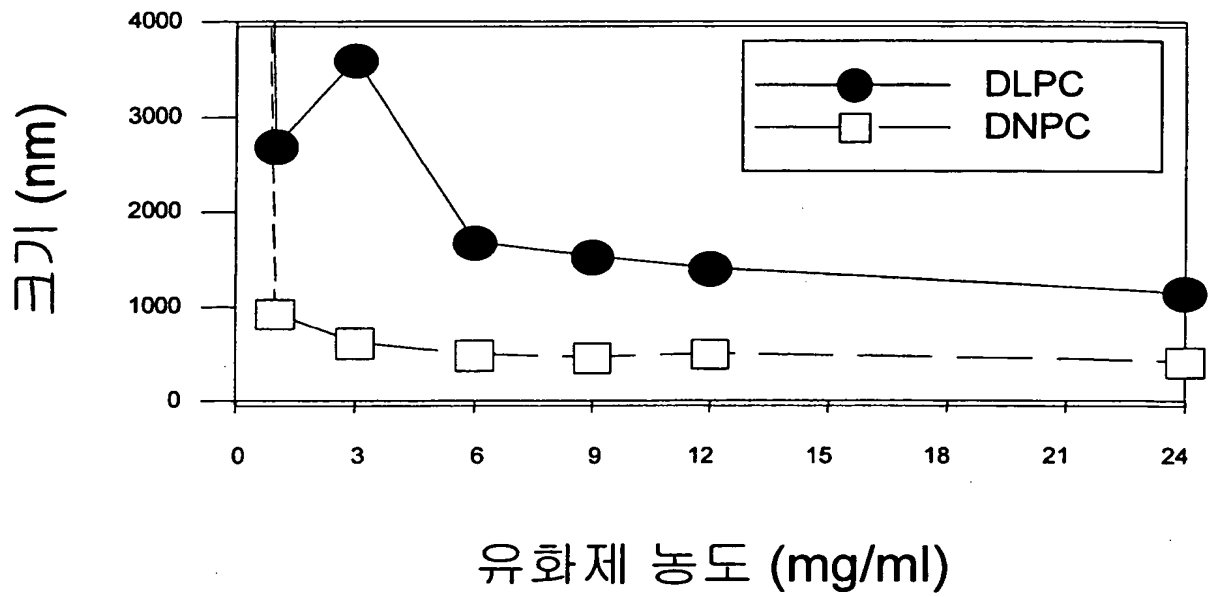
【도 2c】



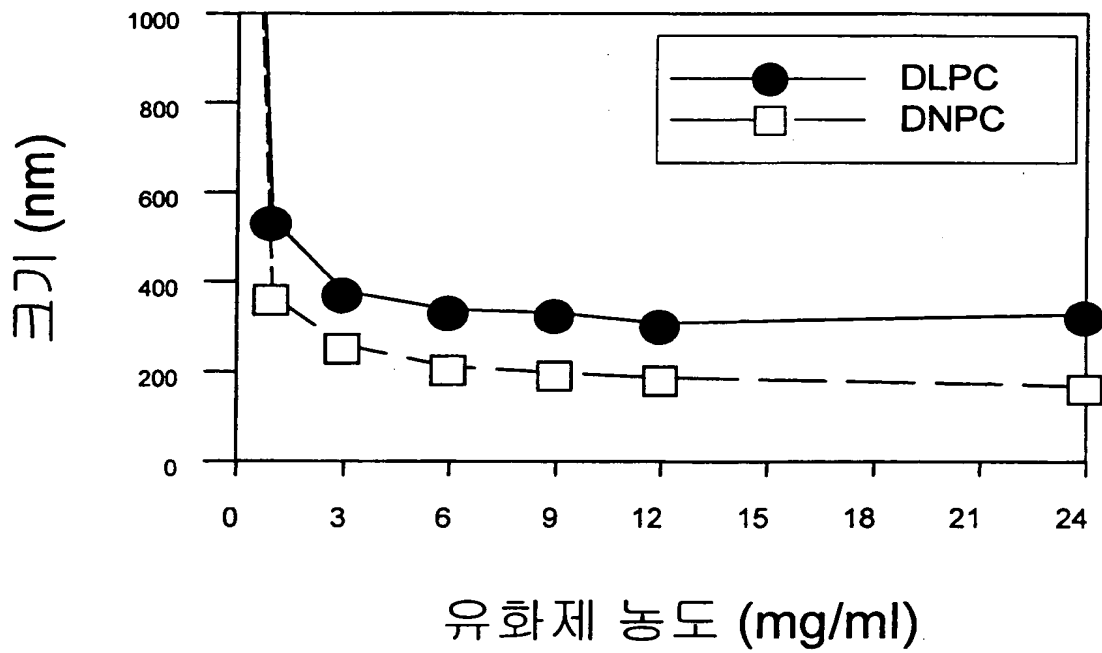
【도 2d】



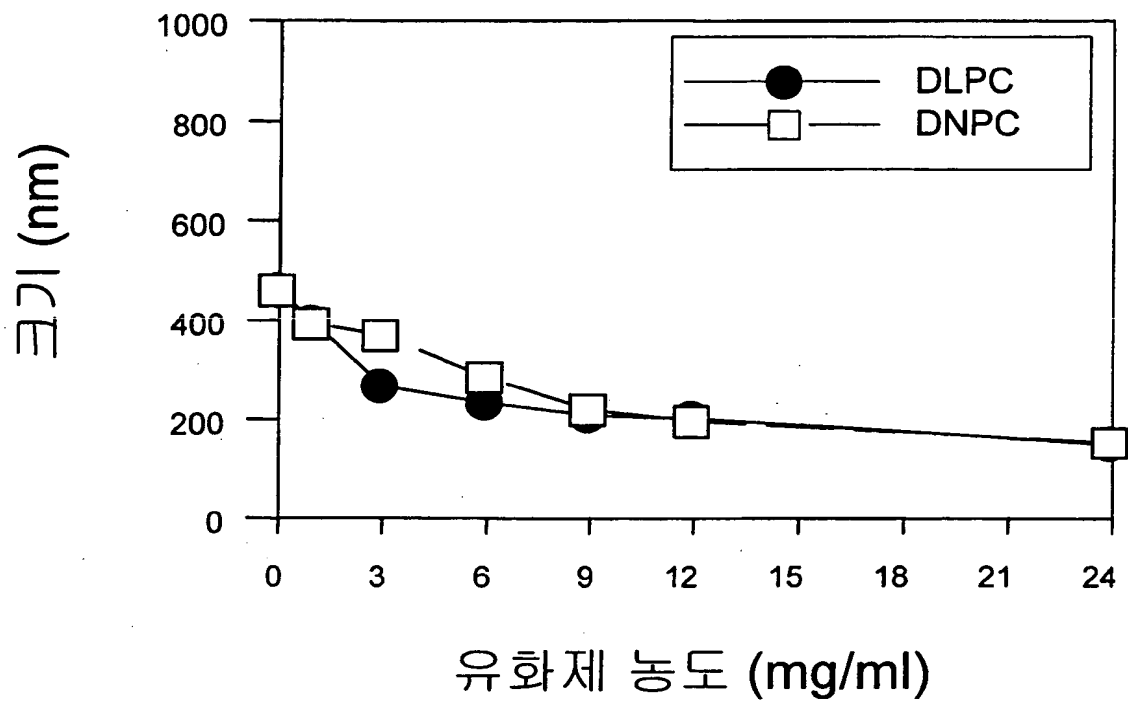
【도 3a】



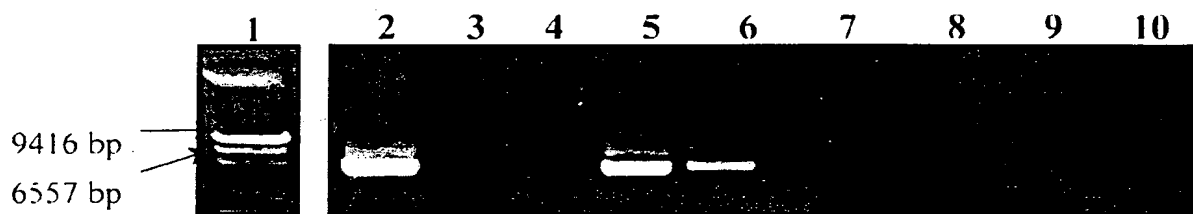
【도 3b】



【도 3c】



【도 4】

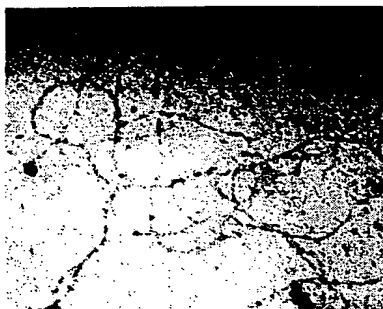


【도 5】

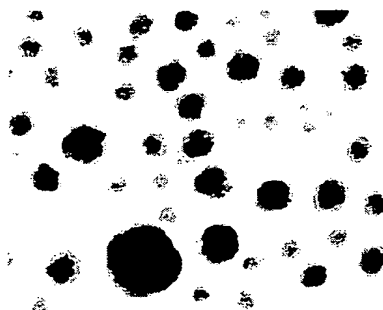


【도 6】

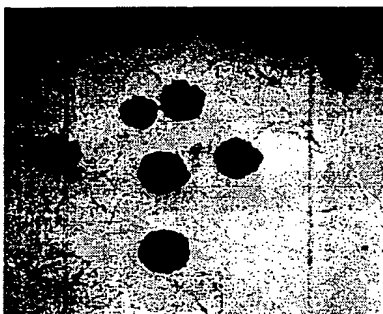
가



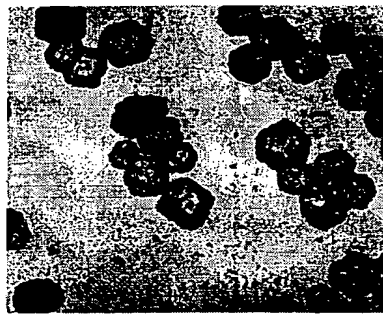
나



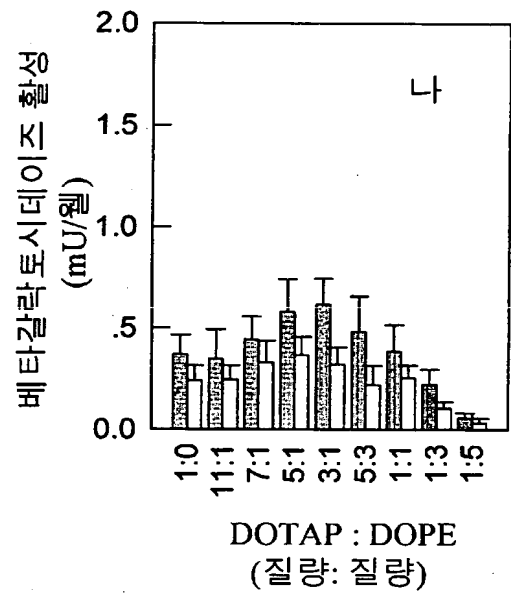
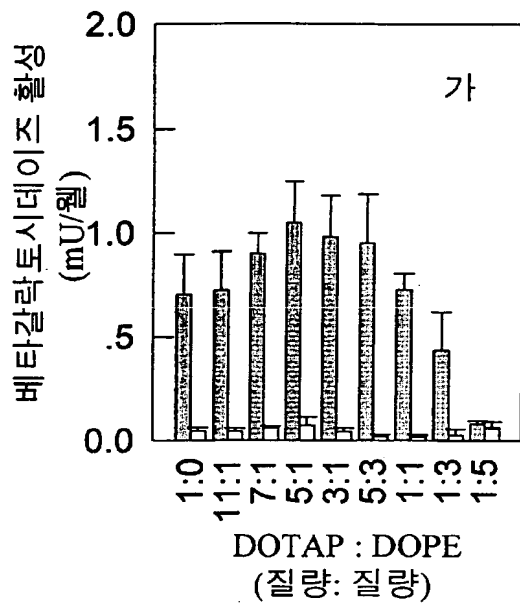
다



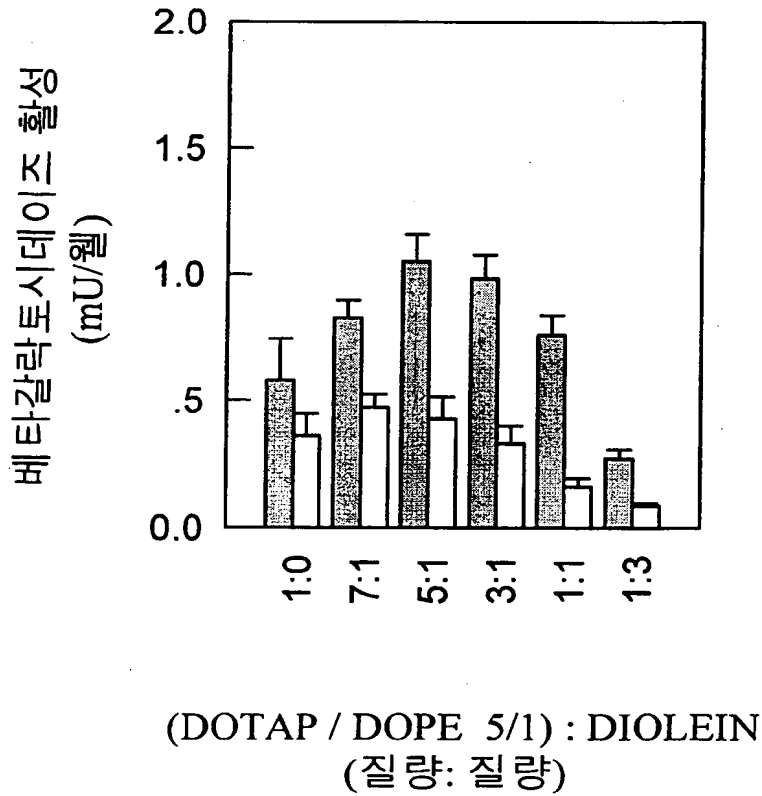
라



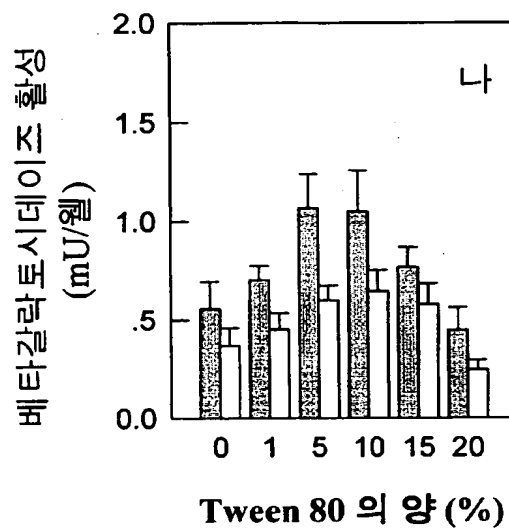
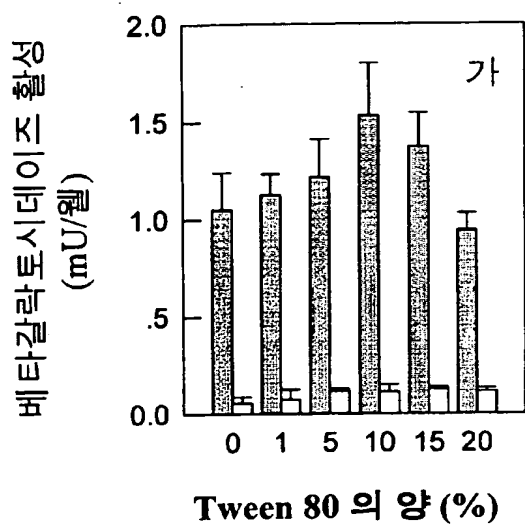
【도 7】



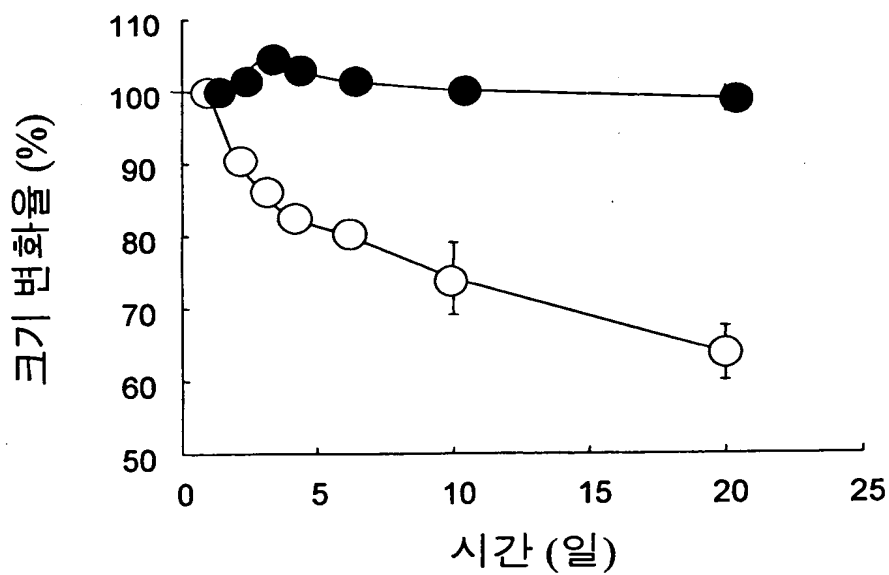
【도 8】



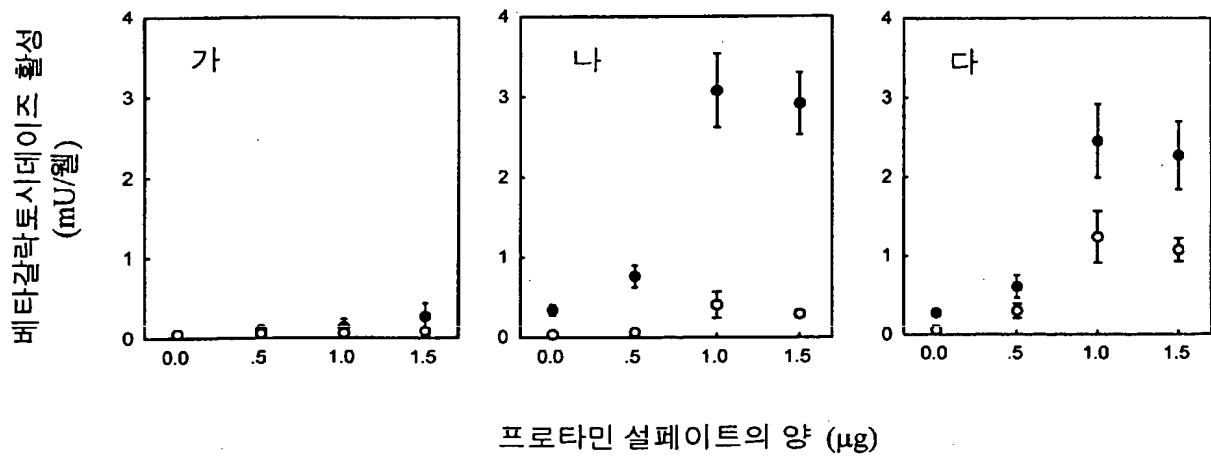
【도 9】



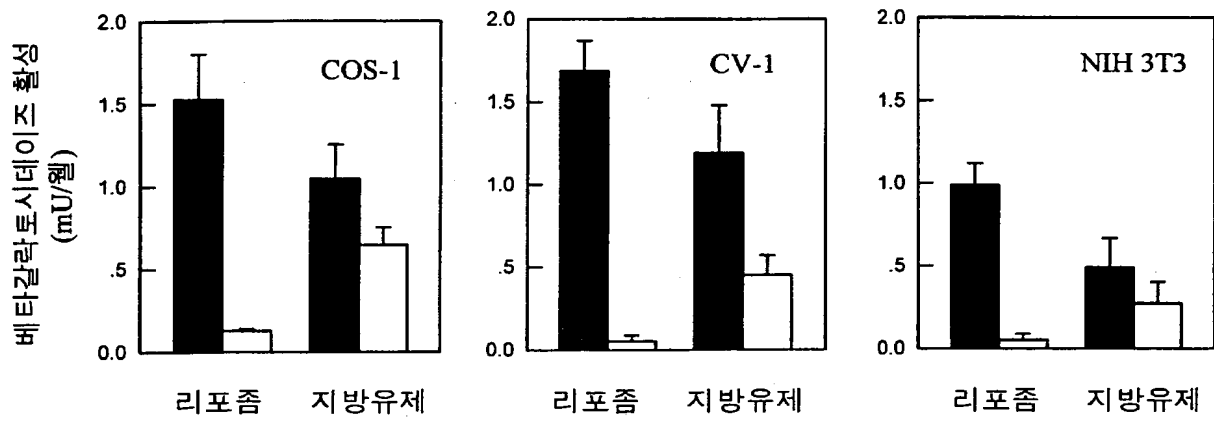
【도 10】



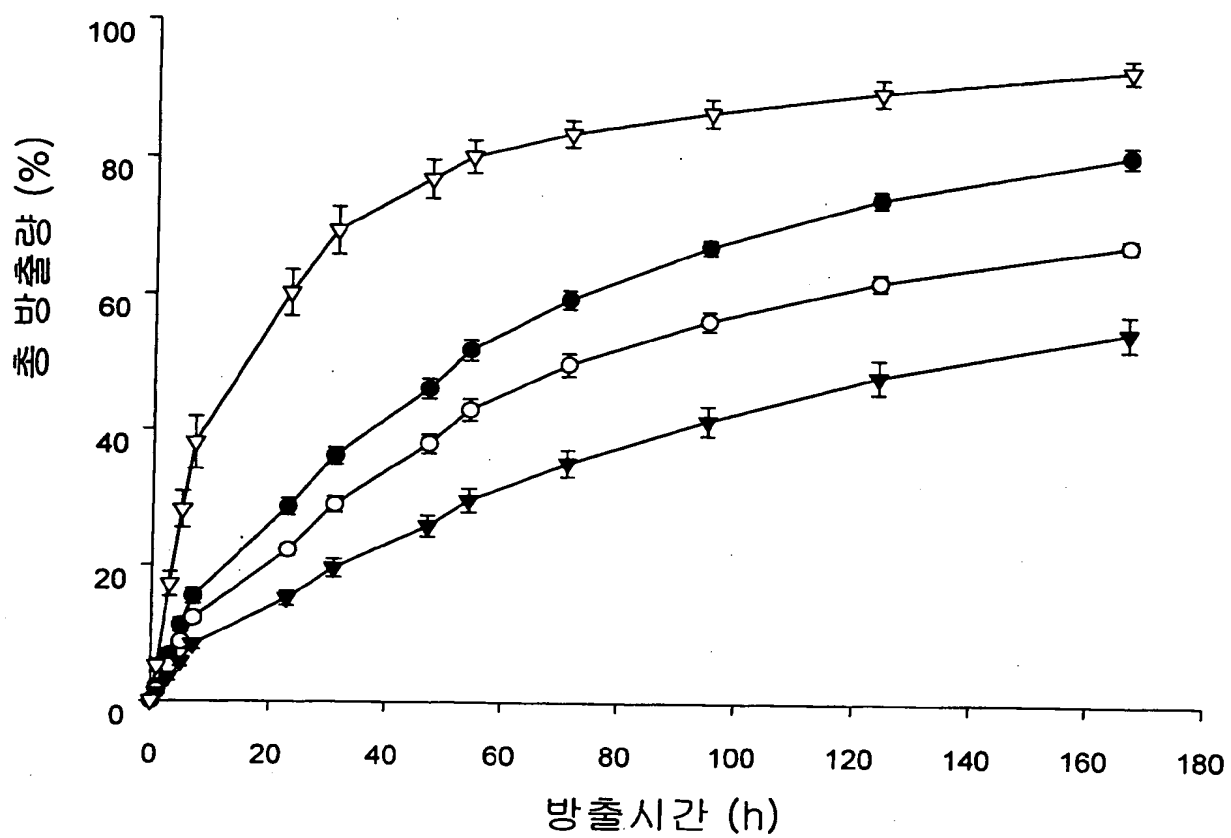
【도 11】



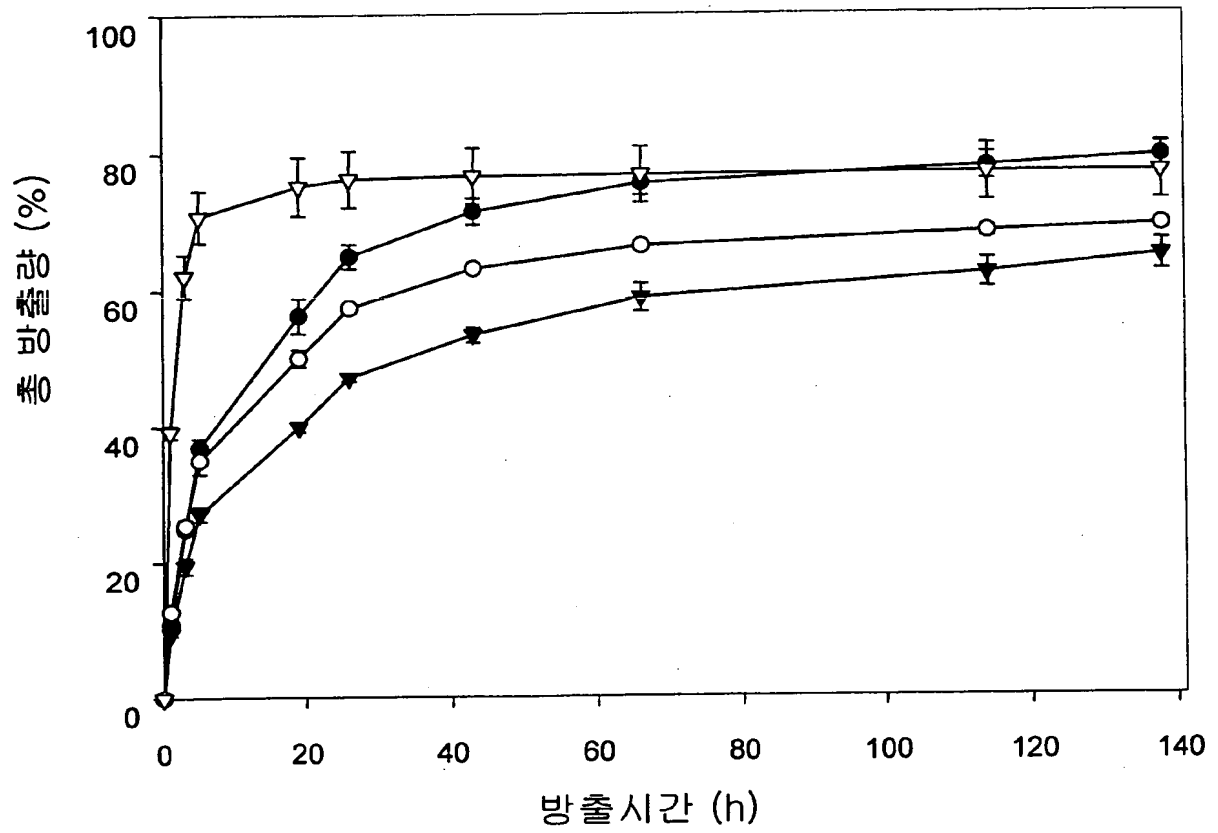
【도 12】



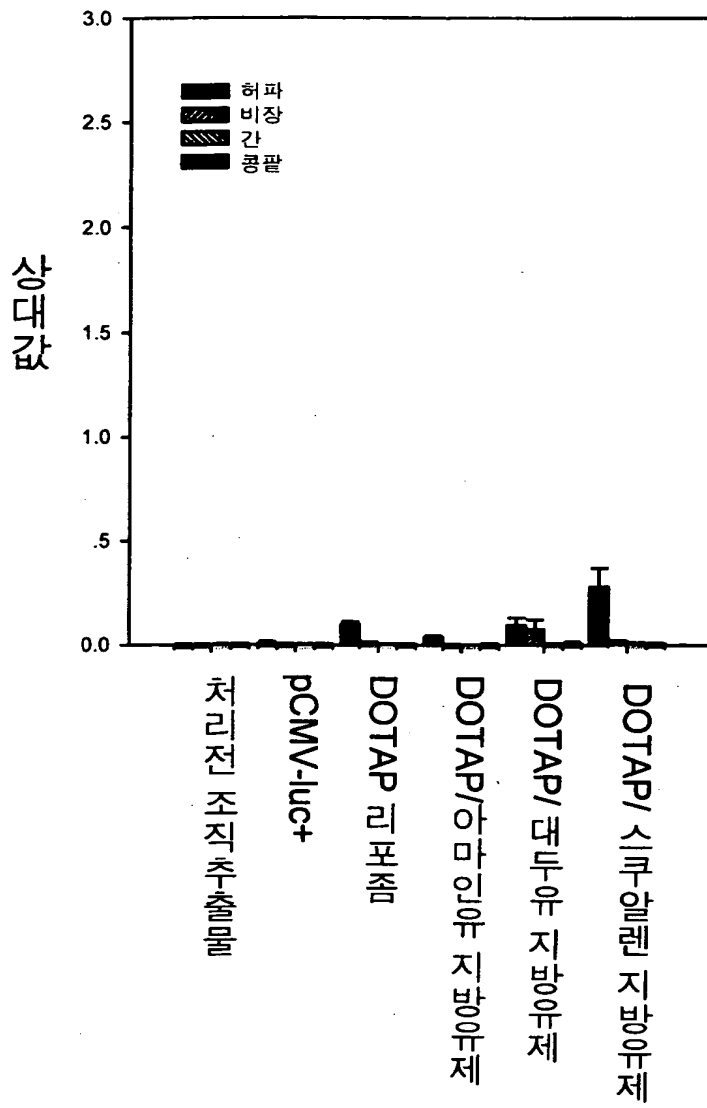
【도 13】



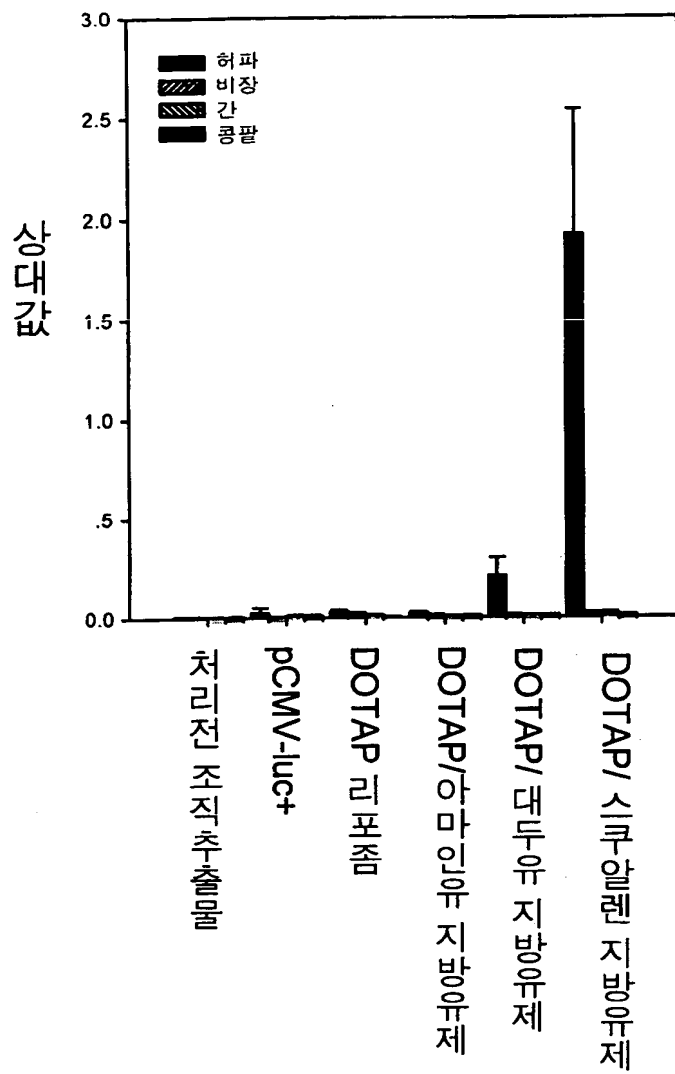
【도 14】



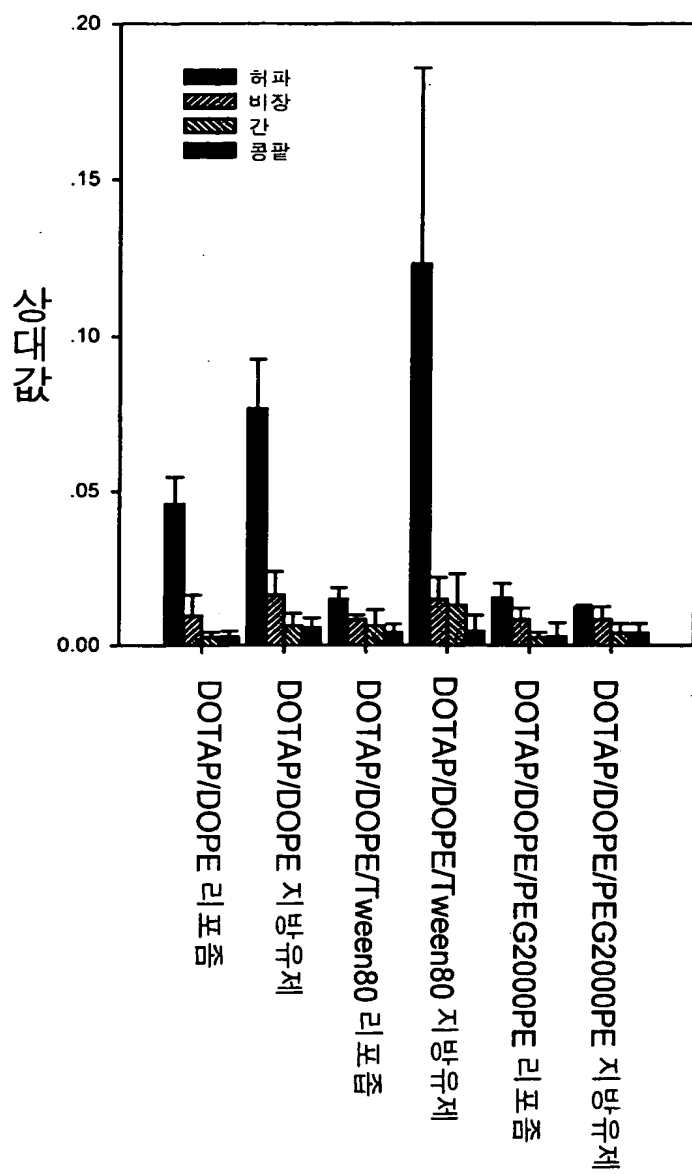
【도 15】



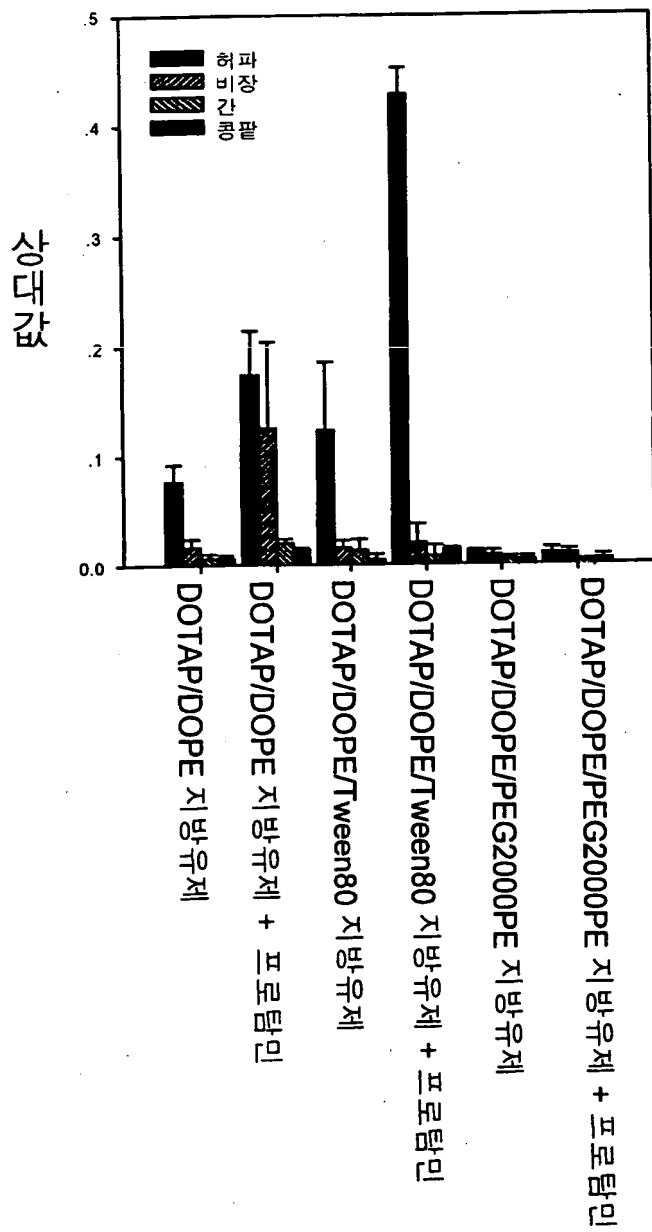
【도 16】



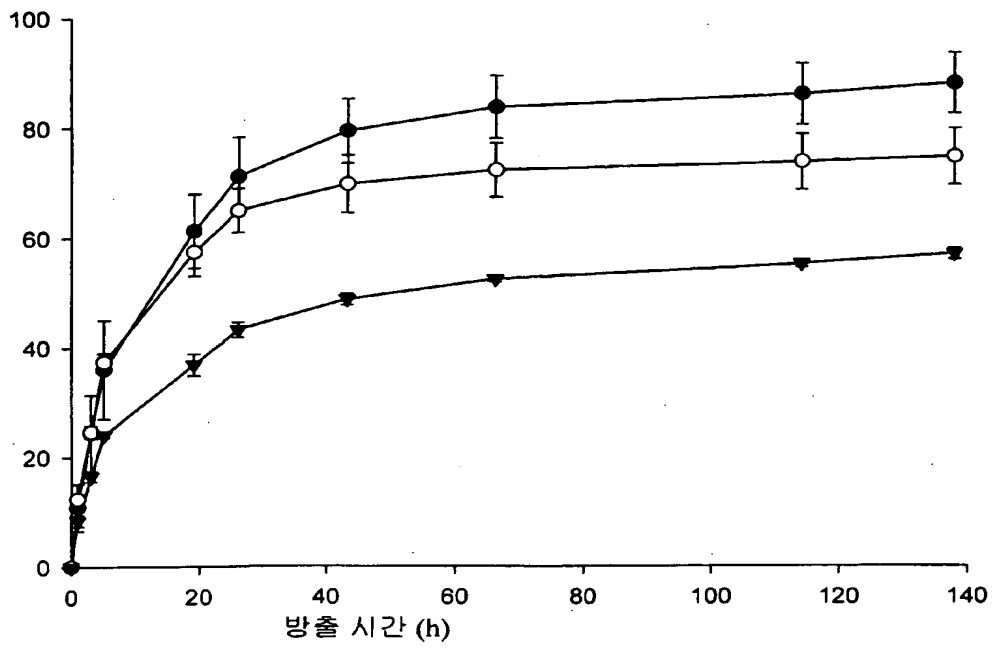
【도 17】



【도 18】



【도 19】



【도 20】

filed

THIS PAGE BLANK (USPTO)